Postverlagsort Berlin

FRESENIUS'
ZEITSCHRIFT
FÜR ANALYTISCHE CHEMIE

BEGRÜNDET VON REMIGIUS FRESENIUS

UNTER MITWIRKUNG DER FACHGRUPPE ANALYTISCHE CHEMIE
DER GESELLSCHAFT DEUTSCHER CHEMIKER
VERTRETEN DURCH
H. KIENITZ W. KOCH H. LUTHER H. SPECKER

HERAUSGEGEBEN VON

W. FRESENIUS UND A. KURTENACKER

181. BAND

VORTRÄGE DER ARBEITSTAGUNG ÜBER
MODERNE METHODEN
DER ANALYSE ORGANISCHER VERBINDUNGEN

MIT 311 TEXTABBILDUNGEN
(ABGESCHLOSSEN AM 5. JULI 1961)

SPRINGER-VERLAG BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
J.F. BERGMANN · MÜNCHEN
1961

Z. analyt. Chem.

Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie

Begründet 1862 und herausgegeben bis Band 20 (1881) von *C. Remigius Fresenius*, bis Band 36 (1897) von *C. Remigius* und *Heinrich Fresenius*, Band 37—58 herausgegeben von *Heinrich* und *Wilhelm Fresenius* und *Ernst Hinz*, Band 59 (1920) bis Band 105 von *Wilhelm Remigius* und *Ludwig Fresenius*, Band 105 (1936) von *Remigius* und *Ludwig Fresenius*, Band 106—127 (1944) von *Remigius Fresenius*, Band 128 (1948) herausgegeben von *A. Kurtenacker* und ab Band 129 (1949) von *W. Fresenius* und *A. Kurtenacker*. Bis Band 59 (1919) Wiesbaden, C. W. Kreidel, Band 59—62 (1922) Wiesbaden, C. W. Kreidel, und München, J. F. Bergmann, Band 63—127 (1944) München, J. F. Bergmann, ab Band 128 (1948) München, Bergmann und Berlin, Springer.

Die **„Zeitschrift für analytische Chemie"** erscheint nach Maßgabe des eingehenden Materials zur Ermöglichung rascher Veröffentlichung zwanglos in Heften, die zu Bänden vereinigt werden. Der Preis des Bandes beträgt DM 54,—. Sie bringt als „Originalabhandlungen" selbständige Untersuchungen aus allen Gebieten der analytischen Chemie.

Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind. Der Autor verpflichtet sich, sie auch nachträglich nicht an anderer Stelle zu publizieren. Mit der Annahme des Manuskripts und seiner Veröffentlichung durch den Verlag geht das Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder einschließlich des Rechts der fotomechanischen Wiedergabe oder einer sonstigen Vervielfältigung an den Verlag über. Jedoch wird gewerblichen Unternehmen für den innerbetrieblichen Gebrauch nach Maßgabe des zwischen dem Börsenverein des Deutschen Buchhandels e. V. und dem Bundesverband der Deutschen Industrie abgeschlossenen Rahmenabkommens die Anfertigung einer fotomechanischen Vervielfältigung gestattet. Wenn für diese Zeitschrift kein Pauschalabkommen mit dem Verlag vereinbart worden ist, ist eine Wertmarke im Betrage von DM 0,30 pro Seite zu verwenden. *Der Verlag läßt diese Beträge den Autorenverbänden zufließen.*

Der „Bericht über die Fortschritte der analytischen Chemie" enthält, zum Teil in Form von Sammelberichten, kritische Referate über die auf den einzelnen Gebieten an anderer Stelle veröffentlichten Arbeiten über analytische Chemie.

Originalarbeiten und alle sie betreffenden Zuschriften sind zu richten an die

Redaktion der Zeitschrift für analytische Chemie,
Wiesbaden, Kapellenstraße 11/15.

Für Originalabhandlungen wird ein Unkostenersatz von DM 32,— je Druckbogen, jedoch nicht mehr als $1^1/_2$ Druckbogen für einen Beitrag vergütet.

Die Mitarbeiter erhalten von ihrer Arbeit zusammen 40 Sonderdrucke.

Auf möglichst rasche Veröffentlichung der eingelaufenen Arbeiten wird besonderer Wert gelegt.

Springer-Verlag
Heidelberg, Neuenheimer Landstraße 28—30
Fernsprecher 27901; Fernschreibnummer 04-61723
Berlin-Wilmersdorf, Heidelberger Platz 3
Fernsprecher 830301; Fernschreibnummer 01-83319

J. F. Bergmann
München 27, Trogerstraße 56
Fernsprecher 440535

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinn der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

FRESENIUS'
ZEITSCHRIFT FÜR ANALYTISCHE CHEMIE

BEGRÜNDET VON REMIGIUS FRESENIUS

UNTER MITWIRKUNG DER FACHGRUPPE ANALYTISCHE CHEMIE
DER GESELLSCHAFT DEUTSCHER CHEMIKER
VERTRETEN DURCH
H. KIENITZ W. KOCH H. LUTHER H. SPECKER

HERAUSGEGEBEN VON

W. FRESENIUS UND A. KURTENACKER

181. BAND

VORTRÄGE DER ARBEITSTAGUNG ÜBER
MODERNE METHODEN
DER ANALYSE ORGANISCHER VERBINDUNGEN

MIT 311 TEXTABBILDUNGEN

SPRINGER-VERLAG BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
J.F. BERGMANN · MÜNCHEN
1961

Alle Rechte, einschließlich das der Übersetzung in fremde Sprachen und das der fotomechanischen Wiedergabe oder einer sonstigen Vervielfältigung, vorbehalten. Jedoch wird gewerblichen Unternehmen für den innerbetrieblichen Gebrauch nach Maßgabe des zwischen dem Börsenverein des Deutschen Buchhandels e. V. und dem Bundesverband der Deutschen Industrie abgeschlossenen Rahmenabkommens die Anfertigung einer fotomechanischen Vervielfältigung gestattet. Wenn für diese Zeitschrift kein Pauschalabkommen mit dem Verlag vereinbart worden ist, ist eine Wertmarke im Betrage von DM 0,30 pro Seite zu verwenden. *Der Verlag läßt diese Beträge den Autorenverbänden zufließen.*

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Springer-Verlag OHG / Berlin · Göttingen · Heidelberg
Printed in Germany

Druck: Wiesbadener Graphische Betriebe GmbH

Inhalt des 181. Bandes

Vorträge der Arbeitstagung über Moderne Methoden der Analyse organischer Verbindungen

I. Elementaranalyse organischer Verbindungen

Seite

KIRSTEN, W. J., Einige Dezimilligramm- und Ultramikromethoden im Routine-Elementaranalysenlaboratorium. Mit 12 Textabbildungen 1

BELCHER, R., Sub-micro Methods for the Analysis of Organic Compounds. With 2 Figures in the Text 22

SCHÖNIGER, W., Die Kolbenmethode in der organischen Mikroelementaranalyse. Mit 4 Textabbildungen 28

MALISSA, H., Ein Beitrag zur Automatisierung in der Mikroelementaranalyse. Mit 5 Textabbildungen 39

SCHMIDTS, W., und W. BARTSCHER, Grundlagen der konduktometrischen Kohlenstoffbestimmung. Mit 6 Textabbildungen 54

SALZER, F., Ein Mikroschnellverbrennungsautomat zur Bestimmung von Kohlenstoff und Wasserstoff in organischen Stoffen. Mit 7 Textabbildungen 59

RADMACHER, W., und A. HOVERATH, Vereinfachtes Verfahren zur Bestimmung des Kohlenstoffs und Wasserstoffs sowie des Schwefels organischer Substanzen. Mit 4 Textabbildungen 77

SIMON, H., und G. MÜLLHOFER, Manometrisches Verfahren zur C-H-Analyse mit Einwaagen ab 0,3 mg. Mit 2 Textabbildungen 85

GÖTZ, A., Eine schnelle Sauerstoffbestimmung in organischen Substanzen. Mit 8 Textabbildungen 92

GORBACH, S., und F. EHRENBERGER, Über ein halbautomatisches Titriergerät zur Bestimmung kleiner Mengen Kohlendioxid. Anwendung für die direkte Sauerstoffbestimmung in organischen Substanzen und für die C- und CO_2-Bestimmung in wäßrigen Lösungen. Mit 6 Textabbildungen 100

BALLCZO, H., Die besten Möglichkeiten zur Fluorbestimmung organischer Verbindungen. Mit 7 Textabbildungen 110

HERRMANN, M., Über die Brombestimmung durch Röntgenfluorescenzanalyse. Mit 1 Textabbildung 122

II. Bestimmung funktioneller Gruppen organischer Verbindungen

MÜLLER, K., Die Bestimmung der Kohlenstoff-Mehrfachbindung. Mit 1 Textabbildung 126

MERZ, W., Beitrag zur Mikrobestimmung des aktiven Wasserstoffs. Mit 1 Textabbildung 147

HUBER, W., Die potentiometrische Titration von primären, sekundären und tertiären aliphatischen und aromatischen Aminen nebeneinander 158

Seite

III. Bestimmungsmethoden zur Analyse organischer Verbindungen

1. Chemische Methoden

Feigl, F., und V. Anger, Nachweis und Unterscheidung von isomeren organischen Verbindungen mit Hilfe von Tüpfelreaktionen 160

Eberius, E., Wasserbestimmung in organischen Substanzen mit chemischen Methoden 172

2. Elektrochemische Methoden, chemische Methoden mit elektrischer Indication

Cruse, K., Analyse organischer Verbindungen nach der Methode der Hochfrequenztitration. Mit 13 Textabbildungen 180

Ashworth, M. R. F., und W. Walisch, Application of Polarovoltric End-Point Determination to Titration of Organic Compounds 193

Schultze, G. R., und W. Irion, Polarographische Bestimmung von Schwefel und schwefelhaltigen Verbindungen in Erdöl und Erdölprodukten sowie von metallischem Abrieb in Altölen 200

Lamprecht, W., S. Gudbjarnason und H. Katzlmeier, Messung und Differenzierung katalytischer Wasserstoffwellen bei der Polarographie von Sulfhydryl- und Disulfidverbindungen. Mit 5 Textabbildungen 201

Lamprecht, W., und H. Katzlmeier, Polarographie schwefelhaltiger Proteine. Mit 20 Textabbildungen 216

3. Physikalische Methoden

Schmalz, E. O., und W. Kimmer, Beitrag zur infrarotspektroskopischen Simultananalyse (II. Mitteilung). Mit 3 Textabbildungen 229

IV. Trennmethoden zur Analyse organischer Verbindungen

1. Trennung durch kinetische Effekte

Hannig, K., Die trägerfreie kontinuierliche Elektrophorese und ihre Anwendung. Mit 7 Textabbildungen 244

2. Trennung durch Phasengleichgewichte ohne Hilfsphase

Schildknecht, H., Normales Erstarren, Zonenschmelzen und Kolonnenkristallisieren. Mit 30 Textabbildungen 254

3. Trennung durch Phasengleichgewichte unter Verwendung einer Hilfsphase

Hesse, G., Chromatographische Verfahren in der organischen Chemie 274

Hecker, E., Neuere Entwicklungen und Ergebnisse der Substanztrennung durch multiplikative Verteilung. Mit 10 Textabbildungen 284

Stahl, E., Dünnschicht-Chromatographie. Mit 4 Textabbildungen 303

Bergmann, G., H. Spieker und F. Zöhrer, Quantitative Mehrkomponentenanalysen. II. IR- und UV-Chromatographie. Mit 8 Textabbildungen . . . 313

Schnitger, H., Geräte zur Ionenaustausch-Chromatographie im Mikromaßstab 324

Teichert, K., E. Mutschler und H. Rochelmeyer, Die plattenchromatographische Untersuchung von Naturstoffgemischen 325

Endres, H., Chromatographische Untersuchungen von Polyhydroxyphenolen, Chinonen und Hydroxychinonen an Polyamid. Mit 3 Textabbildungen . . 331

Schoenemann, K., G. Jeschek und K. Frommhold, Eine Methode zur quantitativen papierchromatographischen Bestimmung von Zuckern und Zuckeralkoholen. Mit 5 Textabbildungen 338

Seite

KEULEMANS, A. I. M., Der heutige Stand der Gaschromatographie 350

KOVÁTS, E. sz., Zusammenhänge zwischen Struktur und gaschromatographischen Daten organischer Verbindungen. Mit 4 Textabbildungen 351

Aussprache 364

HALÁSZ, I., und G. SCHREYER, Trennleistung und Bodenzahlen bei gaschromatographischen Analysen mit Capillarkolonnen. Mit 10 Textabbildungen 367

HALÁSZ, I., und E. E. WEGNER, Flüssigkeitsbedecktes aktives Aluminiumoxid als stationäre Phase in der Gaschromatographie 382

HALÁSZ, I., und G. SCHREYER, Aufbau und Arbeitsweise eines Capillarchromatographiegerätes mit Flammenionisationsdetektor für quantitative Analysen 384

BAYER, E., G. WAHL und H. G. WITSCH, Präparative Gaschromatographie. II. Mitteilung. Mit 3 Textabbildungen 384

SCHULZ, G., Anwendungsbeispiele der Gaschromatographie in der industriellen Praxis. Mit 6 Textabbildungen 390

WEYGAND, F., B. KOLB und P. KIRCHNER, Gaschromatographische Trennung von N-Trifluoracetyl-dipeptid-methylestern. II. Mitteilung. Mit 1 Textabbildung 396

DIJKSTRA, R., und E. A. M. F. DAHMEN, Analyse von Alkylaluminiumverbindungen mit Hilfe der Gaschromatographie. Mit 3 Textabbildungen. 399

ROTZSCHE, H., und H. RÖSLER, Über Silicone LI. Gaschromatographische Untersuchungen an Methylhydrocyclosiloxanen. Mit 4 Textabbildungen 407

BAYER, E., und L. BÄSSLER, Systematische Identifizierung von Estern im Weinaroma. II. Mitteilung zur systematischen Identifizierung verdampfbarer organischer Substanzen. Mit 3 Textabbildungen 418

V. Aufklärung der Konstitution organischer Verbindungen sowie des Ablaufs organisch chemischer Reaktionen mit chemischen und physikalischen Methoden

DANNENBERG, H., Strukturaufklärung organischer Verbindungen nach chemischen und physikalischen Methoden. Mit 18 Textabbildungen. 425

FRANZEN, V., Aufklärung von Reaktionsabläufen mit Hilfe der Protonenresonanz 443

ENGLERT, G., Über einige Molekülstrukturuntersuchungen mittels Kernresonanzspektroskopie. Mit 5 Textabbildungen 447

WEITKAMP, H., K. H. BÜCHEL, F. WIESE und F. KORTE, Beispiele zur Strukturbestimmung organischer Verbindungen durch Kerninduktionsspektroskopie 455

SCHEFFLER, K., Zur Aufklärung mesomerer Strukturen organischer Radikale durch Elektronenresonanz. Mit 7 Textabbildungen 456

STENHAGEN, E., Massenspektrometrie als Hilfsmittel bei der Strukturbestimmung organischer Verbindungen, besonders bei Lipiden und Peptiden. Mit 20 Textabbildungen 462

KRATKY, O., Messung der Absolutintensität der Röntgenkleinwinkelstreuung von Kolloidteilchen und Makromolekülen zur Bestimmung ihrer Größe und Gestalt. 480

LÄUFER, S., Über die IR-Absorption von Purinkörpern im Bereich 15—20 μ. Mit 4 Textabbildungen 481

KUHN, M., und R. MECKE, Zur Existenz des 1,2,3,4-Thiatriazol-Ringgerüsts. I. Mitteilung über die Umsetzung von Thiosemicarbaziden mit salpetriger Säure. Mit 4 Textabbildungen 487

LÄUFER, S., und F. LINGENS, Über die Kondensationsprodukte aromatischer Amine mit Hydroxyaldehyden. Mit 5 Textabbildungen. 494

Seite

Ziechmann, W., Gewinnung, Auftrennung und Charakterisierung von Huminsäuren. Mit 5 Textabbildungen 503

Braunitzer, G., Die Ermittlung der Konstitution einer klassischen Peptidkette. Mit 7 Textabbildungen 514

Kresze, G., und V. Schmidt, Anwendung von Trifluoressigsäure bei der Analyse von Aminosäuren und Peptiden. Mit 2 Textabbildungen 527

Hartmann, H., J. Heidberg, J. Heintges und H. Jung, Analytische Probleme bei kinetischen Untersuchungen über die Spaltung von Di- und Tripeptiden. Mit 1 Textabbildung 533

Fasold, H., und F. Turba, Spaltung von Dinitrophenyl-aminosäuren. Mit 2 Textabbildungen 539

Niemann, A., Über die Hydrolyse der Peptidbindung 543

Cramer, F., Anwendung der Chromatographie zur Strukturaufklärung von Oligonucleotiden. Mit 4 Textabbildungen 545

VI. Anwendung von Isotopen zur Analyse organischer Verbindungen und zur Aufklärung des Ablaufs organisch-chemischer Reaktionen

Kratzl, K., G. Billek, G. Puschmann, H. Simon, K. Gruber und D. E. Bland, Radiochemische und gaschromatographische Methoden zum Studium der reversiblen Alkoxylierung und Alkylierung 550

Ache, H. J., A. Thiemann und W. Herr, Radiogaschromatographische Analyse tritiummarkierter aromatischer Nitro- und Halogenverbindungen bei höheren Temperaturen. Mit 6 Textabbildungen 551

Lieser, K. H., und H. Elias, Radiopapierchromatographie der Isomeren des 1.2.3.4.5.6-Hexachlor-cyclohexans (HCH). Mit 8 Textabbildungen. . . . 560

Riedel, O., und H. Kienitz, Die Bildung von Terephthalat durch Carboxylgruppenumlagerung in einer $^{14}CO_2$-Atmosphäre 567

Schäfer, G., W. Lamprecht und K. Stuhlfauth, Nachweis und Verteilung von Sulfanilylharnstoffen in Zellstrukturen und Autoradiographie von Gewebeschnitten mit dem tritium-markierten oralen Antidiabetikum. Mit 4 Textabbildungen 568

Ködding, R., W. Lamprecht, H. P. Wolff, J. Karl und Kh. R. Koczorek, Bestimmung von Corticosteroiden im Blut durch Doppelmarkierung und Messung von ^{14}C und ^{3}H in der Gasphase. Mit 1 Textabbildung. 574

Namen- und Sachverzeichnis 581

Die Arbeitstagung wurde vorbereitet und stand unter der Leitung von F. Weygand, München, und H. Kienitz, Ludwigshafen.

Vorträge der Arbeitstagung

Moderne Methoden der Analyse organischer Verbindungen

vom 26. bis 29. Oktober 1960 in München

I. Elementaranalyse organischer Verbindungen

Institut für medizinische Chemie der Universität Uppsala, Schweden

Einige Dezimilligramm- und Ultramikromethoden im Routine-Elementaranalysenlaboratorium

Von

WOLFGANG J. KIRSTEN

Mit 12 Textabbildungen

(Eingegangen am 26. Oktober 1960)

Als wir vor 11 Jahren mit Versuchen anfingen, mit geringeren Substanzmengen als für die übliche Mikroanalyse zu arbeiten, geschah dies, weil die medizinischen und biochemischen Forscher immer wieder mit sehr kleinen Substanzmengen zu uns kamen, die sie gern analysiert haben wollten. Ein weiterer Grund war zuweilen auch, daß die Doppelwerte einer gewöhnlichen Mikroanalyse nicht miteinander übereinstimmten, und daß nicht genügend Substanz da war, um eine 3. Analyse auszuführen.

Versuche, die Preglschen Methoden direkt in kleineren Apparaturen durchzuführen, mißglückten bei uns, anscheinend, weil dann das Verhältnis zwischen Substanzmenge und Blindwerten zu ungünstig wurde. — Andere Aufschluß-, Trennungs- und Meßmethoden mußten deshalb ausgearbeitet werden.

Die 1. Methode, mit der wir guten Erfolg hatten, war die Bestimmung von Schwefel.

Schwefelbestimmung

Bei unserer Methode verbrennt man die Substanz in Sauerstoff in einem Quarzrohr[9]. Die Verbrennungsgase gelangen im gleichen Quarzrohr in eine Kammer, in die ein Überschuß von Wasserstoff bei 1200°C eingeleitet wird. Der Schwefel wird dabei zu Schwefelwasserstoff hydriert. Dieser wird in einem Absorptionsrohr in alkalischer Jodatlösung aufgefangen und zu Schwefelsäure oxydiert[3]. Dann bestimmt man entweder den Überschuß an Jodat durch Titration mit Thiosulfat, oder das reduzierte Jodid colorimetrisch[11].

Abb. 1 zeigt die verwendete Apparatur. Der Sauerstoff strömt durch Druckregler, Strömungsmesser und Gasreinigungsrohre in das Verbrennungsrohr bei *E*.

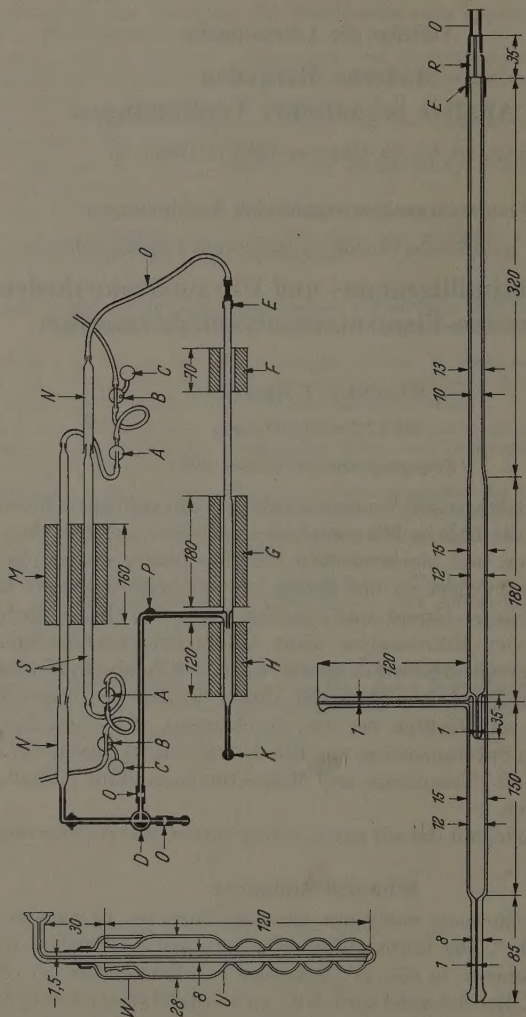


Abb. 1. *Schwefelbestimmungsapparat.* *A* Strömungsmesser; *B* T-Rohr-Druckregulator gefüllt mit Quecksilber; *C* Niveaugefäß für Druckregulator; *D* Dreiwegehahn; *E* Eintrittsöffnung des Verbrennungsrohres; *F* Beweglicher Verbrennungsofen, Temperatur 730—750°C; *G* Langofen, Temperatur 730—750°C; *H* Hydrierofen; Temperatur 1200°C; *K* Kugelschliff; *M* Gasreinigungsofen, 900°C; *N* Natronkalkröhren; *O* Schwefelfreier Latexschlauch; *P* Kugelschliff; *R* Glascapillare; *S* Quarzverbrennungsröhren zur Gasreinigung; *U* Absorptionsrohr; *W* Glocke über Absorptionsrohr, die das Eintreten von Luft verhindern soll (ist bei der beschriebenen Methode nicht nötig)

Die Substanz liegt in dem Rohr zwischen dem Klappofen *F* und dem Langofen *G*. Der Klappofen *F* wandert nach links und die Substanz wird da im Sauerstoffstrom verbrannt. Die Verbrennungsgase gelangen dann durch die Capillare in den Hydrierraum im Ofen *H*. Von *P* herkommend strömt ein Überschuß von Wasserstoff

gleichfalls in den Hydrierraum, in dem der Schwefel zu Schwefelwasserstoff hydriert wird. Durch den Schliff *K*, an dem das Gaseinleitungsrohr festgeklemmt ist, gelangt der Schwefelwasserstoff in das Absorptionsrohr *U*, das mit 6 ml 0,05 n Kaliumjodatlösung in 10 n Kalilauge beschickt ist. Das Rohr befindet sich bei der Absorption in einem elektrischen Heizblock auf 130° C. Bei der Absorption reagiert der Schwefelwasserstoff sofort mit dem Kaliumjodat, das zu Jodid reduziert wird.

Wenn die Verbrennung beendet ist, wird das Absorptionsrohr abgenommen, das Einleitungsrohr mit 2 ml 7%iger Kaliumjodatlösung sowie mit 3 ml Wasser abgespült, anschließend wird das Absorptionsrohr in Leitungswasser gekühlt.

Der Dreiwegehahn *D* wird nun so gedreht, daß der Wasserstoff durch Öffnung *O* ins Freie strömt. Der Weg nach *P* ist geschlossen, wodurch das ganze Verbrennungs- und Hydrierrohr mit Sauerstoff gefüllt wird und jede Explosionsgefahr ausgeschlossen ist. — Das Rohr kann nun bei *E* geöffnet und die nächste Substanz eingeführt werden usw.

Nun gibt man zu der Lösung im Absorptionsrohr 3 ml Tetrachlorkohlenstoff und 5 ml 10 n Schwefelsäure. Man schüttelt, wobei man durch vorsichtiges Anheben des Glasstopfens gelegentlich für Druckausgleich sorgt, fügt noch 2mal 5 ml der Schwefelsäure hinzu und schüttelt schließlich in der angegebenen Weise 20 sec lang. Ist die durch das jetzt als J_2 vorhandene Jod gefärbte CCl_4-Schicht zu stark gefärbt, kann man mit gemessenen Mengen an diesem Lösungsmittel verdünnen. Jetzt schüttelt man das gut verschlossene Rohr 10 min in einer Schüttelmaschine, kühlt und zentrifugiert das Wasser ab. Die photometrische Jodbestimmung in der so getrockneten Tetrachlorkohlenstofflösung erfolgt bei 513 nm. Bei der Verwendung von 3 ml Tetrachlorkohlenstoff und einer 5 cm-Küvette geben 50 μg Schwefel eine Absorption von 0,373.

Die Mannigfaltigkeit der chemischen Reaktionen des Jods macht es möglich, diese Bestimmungsmethode zu variieren und beispielsweise die Empfindlichkeit zu erhöhen[11]. Auch eine titrimetrische Methode zur Mikroschwefelbestimmung ist beschrieben[12].

Der große praktische Vorteil dieser Methode im Routinelaboratorium besteht darin, daß der gleiche Apparat und hauptsächlich auch die gleichen Lösungen wie für die normale Mikroanalyse verwendet werden können. Man braucht nur die Temperatur der beiden Verbrennungsöfen auf etwa 730—750°C herabzusetzen, um Blindwerte und zu tiefe Resultate zu vermeiden. Die einzige nennenswerte Fehlerquelle dieser Methode scheint flüchtige Kieselsäure zu sein. Die tiefe Verbrennungstemperatur bringt keinerlei Nachteile mit sich, da eine quantitative Zerstörung der Substanz endgültig während der Hydrierung bei 1200°C erreicht wird. — Auch in der normalen Mikroanalyse und Spurenanalyse kann die Verbrennung aus dem gleichen Grunde sehr schnell durchgeführt werden. Man darf hierbei nur nicht so weit gehen, daß im Verbrennungs- und im Hydrierungsofen Kohle abgeschieden wird.

Bei der Bestimmung des Schwefelwasserstoffes durch Jodatoxydation und Rücktitration mit Thiosulfat stören Stickstoff und Halogene nicht, Phosphor stört nur ganz unbedeutend[12]. Die colorimetrische Jodatmethode für kleine Schwefelmengen wird von Jod und Phosphor gestört. Versuche, die Störungen zu vermeiden, gaben Erfolg versprechende

Resultate, sind aber noch nicht weitergeführt worden, weil die Ultramikrobestimmung von Schwefel in Gegenwart größerer Mengen dieser Elemente von uns bisher nicht verlangt worden ist. — Aus Substanzen, die Metalle, vor allem Alkalimetalle, enthalten, wird der Schwefel mit Vanadiumpentoxid vertrieben[8,26].

Man zieht in diesem Falle den kalten Ofen *F* über die Substanz, erhitzt langsam bis auf 1000° C, und beläßt die Substanz 20 min auf dieser Temperatur. Da Vanadiumpentoxid manchmal geringe Mengen Schwefel enthält, die die Ultramikroanalyse stören, reinigt man es, indem man es in einem dickwandigen Quarztiegel zum Schmelzen erhitzt und mit einer Quarzcapillare 1 Std lang Sauerstoff hindurchbläst.

Bei der Analysenmethode für Schwefel wird nicht ganz quantitativ zu Sulfid hydriert, sondern anscheinend auch eine geringe Menge Schwefel gebildet. Diese Menge ist jedoch gut reproduzierbar. Da bei der beschriebenen Oxydationsmethode auch dieser Schwefel mit erfaßt wird, ist nur ein empirischer Faktor von 1,015 für die Korrektur der Resultate notwendig. Der Faktor ist von Gasgeschwindigkeiten, Schwefelmengen usw. unabhängig, nur die Hydrierungstemperatur verändert ihn[12].

Die Methylenblaumethode ist eine äußerst empfindliche Methode für die colorimetrische Bestimmung kleiner Mengen Sulfid. Bei dieser Methode läßt man das Sulfid mit p-Dimethylaminoanilin und Eisen(III)-ionen reagieren, wobei sich der Farbstoff Methylenblau bildet. Die Methode wurde vor kurzem von GUSTAFSSON[6] gründlich untersucht. Die Verf. fand, daß $66{,}7 \pm 0{,}5\%$ des Sulfides in Methylenblau übergeführt werden, und sie gibt genaue Arbeitsvorschriften und Literaturhinweise. — Wir haben nun diese Methode mit unserem Apparat untersucht und erhielten sehr gut reproduzierbare Resultate, aber eine $3{,}9\%$ tiefere Ausbeute, die ihren Grund wahrscheinlich in der oben erwähnten unvollständigen Hydrierung hat. Die Methode arbeitet schneller als die oben beschriebene colorimetrische Jodatoxydationsmethode. Wir haben mit ihr schon eine große Anzahl Ultramikro- und Spurenanalysen ausgeführt, Untersuchungen über Störungen haben wir jedoch noch nicht gemacht. Da aber die Methode für Sulfid spezifisch ist, sind größere Störungen von anderen Elementen kaum zu erwarten. — Um ihre Empfindlichkeit zu erhöhen, wurden Versuche gemacht, den Farbstoff aus der Reaktionslösung zu extrahieren. Benzylalkohol, Nitromethan, Nitrobenzol wurden als geeignet befunden. Am besten reagierte jedoch p-sec.-n-Amylphenol, Eastman P 5960, das in der Reaktionslösung unlöslich ist. Es gelang uns, durch einmaliges Schütteln mit 1 ml Amylphenol aus 100 ml dunkelblau gefärbter Reaktionslösung das Methylenblau so zu extrahieren, daß keine für das bloße Auge sichtbare Farbspur in der Wasserlösung zurückblieb. Die organische Phase war wie Tinte gefärbt.

Leider wird das p-sec.-n-Amylphenol bei langem Stehen gelblich. Sofern diese Farbe aber nicht sehr stark ist, hat sie beim Absorptionsmaximum des Methylenblaus keine nennenswerte Lichtabsorption und stört die Methylenblaubestimmung kaum. p-sec.-Amylphenol kann leicht gereinigt werden. Da es bei Zimmertemperatur auskristallisiert, muß es vor der Benützung etwas erwärmt werden. Seit einiger Zeit sind aber einige andere Alkylphenole im Handel (Hüls, Eastman, Schuchardt) darunter auch einige bei Zimmertemperatur flüssige, welche vielleicht noch besser zum Ausschütteln des Methylenblaus geeignet sind*.

Da der Schwefel ein biochemisch wichtiges Element ist, sind noch verschiedene andere Ultramikromethoden für seine Bestimmung ausgearbeitet worden. Einige benützen die Zersetzung mit Kalium nach ZIMMERMANN[25] mit anschließender Methylenblaureaktion[1,24]; andere eine Reduktionsmethode für Sulfat nach vorheriger Verbrennung der organischen Substanz nach verschiedenen Methoden. Auch diese Reduktionsmethode ist kürzlich genau von GUSTAFSSON[7] untersucht und als sehr zuverlässig und genau befunden worden. Die Verf. gibt genaue Arbeitsvorschriften und Literaturhinweise. Da die Verbrennung und Reduktion in verschiedenen Arbeitsgängen ausgeführt werden müssen, sind die Methoden jedoch recht zeitraubend für die organische Elementaranalyse.

Halogenbestimmung

Während für die genaue ultramikroanalytische Bestimmung von Schwefel mehrere gute Methoden vorliegen, sind nur wenige für Chlor und Brom bekannt. Da es an empfindlichen Meßmethoden für Chlorid und Bromid nicht fehlt, und auch die Veraschung von Probesubstanzen keine größeren Schwierigkeiten bereiten dürfte, hat dies wohl seinen Grund darin, daß weniger medizinisches und biochemisches Interesse für die Bestimmung dieser Elemente vorliegt. Auch wir haben nicht sehr viel auf dem Gebiet gearbeitet. Für die Veraschung haben wir die Verbrennungshydrierungsmethode[10] und die Kolbenverbrennungsmethode[19] benützt. Die Messung des Chlorides und Bromides wurde nach einer Modifikation einer bekannten Methode vorgenommen[2]. Bei dieser läßt man das Halogenid mit Quecksilberrhodanid reagieren, wobei Rhodanidion in Freiheit gesetzt wird. Dieses reagiert in der gleichen Lösung mit dreiwertigem Eisen, wobei die bekannte rote Farbe entsteht, deren Extinktion bei 460 nm gemessen wird. (Vergleiche auch[23].) Da beide der Bestimmung zugrunde liegende Reaktionen Gleichgewichts-

* Für Ausschüttelungsverfahren sei auf diese Klasse der Alkylphenole besonders hingewiesen. Sie haben anscheinend das Lösungsvermögen der Phenole, sind aber weitgehend unlöslich in Wasser. Sie dürften demnach potentielle Ausschüttelungsreagentien sein. — O-tert. Butylphenol (Dow) hat gute Extraktionseigenschaften.

reaktionen sind, ist es sehr wichtig, daß die Lösung bei der Messung immer die gleiche Zusammensetzung und Temperatur hat.

Reagentien. *Eisenlösung.* Man löst 10 g Eisen(III)-nitrat, $Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ sowie 1 g Ammoniumnitrat in 100 ml 5 m Salpetersäure. — *Rhodanidlösung.* 360 mg Quecksilberrhodanid[2] werden in 100 ml absolutem Alkohol gelöst.

Methode. Chlor- oder Bromlösung, die 70—800 μg Cl oder 150—1800 μg Br enthält, wird in einen 25 ml-Meßkolben pipettiert und mit Wasser auf 5,0 ml verdünnt. Man versetzt mit 10 ml absolutem Alkohol, 2 ml Rhodanidlösung und nach kurzem Umschwenken mit 3 ml Eisenlösung. Nach Mischen verdünnt man die Lösungen mit absolutem Alkohol auf 25 ml und mißt die Farbe in einer 0,5 oder 0,25 cm-Küvette bei 460 nm. Eine Blindprobe wird abgezogen.

Dieses Verfahren der Laboratorien der A.G. Pharmacia Uppsala ist für nicht allzu kleine Mengen Halogen ausgearbeitet worden. Wir fanden es im kleineren Lösungsvolumen und 1 cm-Küvetten gut verwendbar für bedeutend geringere Halogenmengen. Die Methode hat den Vorteil, sehr schnell und einfach zu sein. Die Eichkurve, Extinktion gegen Mikrogramm Chlor bzw. Brom ist linear.

Jodhaltige Verbindungen haben wir auf die gleiche Weise verascht: Nach Reduktion mit Hydrazinsulfat wird der Rückstand mit Nitrit in schwefelsaurer Lösung zu freiem Jod oxydiert, das in Tetrachlorkohlenstoff 10 min lang ausgeschüttelt, und dessen Extinktion bei 513 nm gemessen wird.

Diese wohlbekannte aber selten benützte Methode ist nicht besonders empfindlich. Sie hat aber den Vorteil, daß sie sehr einfach ist, keine Blindwerte gibt, immer gut funktioniert und kaum durch andere Elemente gestört wird. Man kann ihre Empfindlichkeit durch Messung in langen Küvetten sehr erhöhen.

Für die Bestimmung kleiner Mengen Jod gibt es viele Möglichkeiten, die in der vielseitigen Reaktivität des Jods begründet sind. Die meisten Methoden, die mit Potenzierungsverfahren durch Oxydation des Jodes zu Jodat arbeiten, stellen sehr hohe Anforderungen an die Reinheit der Reagentien und an das Können des Analytikers.

Stickstoffbestimmung nach Dumas

Der Stickstoff ist eines der biochemisch und medizinisch interessantesten Elemente. Es ist dehalb nicht verwunderlich, daß eine große Anzahl empfindlicher Bestimmungsmethoden dafür ausgearbeitet worden ist. In den meisten Substanzen von biochemischem Interesse liegt der Stickstoff als Aminostickstoff vor, der nach KJELDAHL bestimmt werden kann. Da man auch kleine Mengen Ammoniak mit großer Genauigkeit titrimetrisch oder colorimetrisch erfassen kann, wird diese Methode allgemein gern benützt, bei der Stickstoff in organische Substanzen durch nasse Verbrennung in Ammoniumionen übergeführt werden kann. Da diese Methode nicht bei allen Arten Substanzen gleich gut funktioniert, versuchten wir die ziemlich universell anwendbare

Stickstoffbestimmungsmethode nach DUMAS in verkleinertem Maßstabe auszuführen. Wir hatten vorher eine Mikro-Dumas-Methode ausgearbeitet, die mit Nickeloxid als Verbrennungskatalysator funktionierte, und die sich durch große Genauigkeit und sehr kleine Blindwerte auszeichnete.

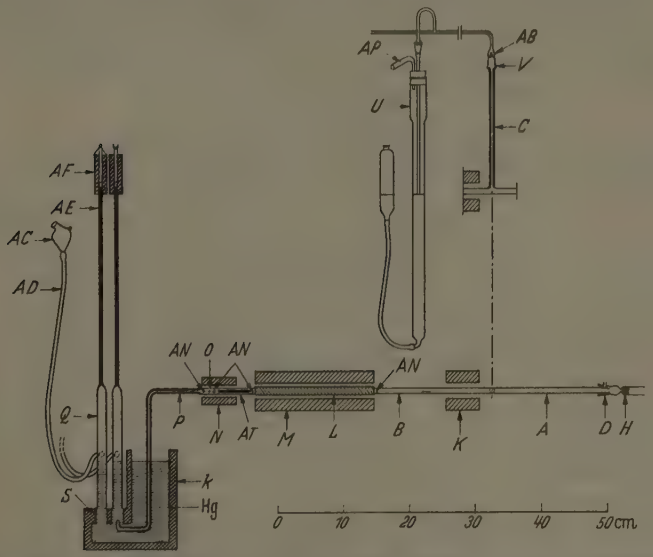


Abb. 2. *Ultramikro-Stickstoffbestimmungsapparat.* *A* Teil des Verbrennungsrohres für Rückwärtsspülung; *B* Teil des Verbrennungsrohres, in dem die Substanz vergast wird; *C* Seitenrohr, durch das das Kohlendioxid einströmt; *D* Schliff, durch den die Substanz eingeführt wird; *H* Capillare, durch die während der Verbrennung Kohlendioxid ausströmt; *K* Beweglicher Ofen, 1050° C; *k* Azotometerfuß aus durchsichtigem Plastikmaterial, mit Quecksilber gefüllt; *L* Teil des Verbrennungsrohres mit Nickeloxidfüllung; *M* Langofen, 1000° C; *N* Wärmofen, ~ 130° C; *O* Hopcalitefüllung; *P* Quarzcapillare; *Q* Azotometerrohr, weiter Teil; *S* Schliffe im Azotometerfuß; *AT* Quarzstab, der das Verbrennungsrohr ausfüllt; *U* T-Rohrdruckregler, mit Quecksilber gefüllt; *V* Schliff Metall-Quarz, mit Siliconfett geschmiert; *AB* Capillare, mit Gummi im Schliffe *V* gehalten; *AC* Niveaugefäß für das Azotometer; *AD* Polyäthylenschlauch, 3 mm Durchmesser; *AE* Geeichte Meßcapillare. Das obere Ende der Capillare ist plan geschliffen; es wird mit einem Gummistopfen geschlossen, der auf den Schliff gepreßt wird. Der Gummistopfen ist in ein Glasrohr eingekittet, das sich im Trichter *AF* befindet; *AF* Trichter des Azotometers aus durchsichtigem Plastikmaterial; *AP* Absorptionsrohr mit Jodkohle; *AN* Quarzwolle

Es erschien deshalb vorteilhaft, auf der gleichen Grundlage weiterzuarbeiten. Unsere Versuche zeigten, daß die größte Fehlerquelle in der Löslichkeit des Stickstoffes in Gummi und Hahnfett zu suchen war. Jede Berührung zwischen Kohlendioxid, Substanzstickstoff und solchen Materialien mußte also vollständig vermieden werden. Um eventuelle Fehler durch die — viel geringere — Löslichkeit des Stickstoffes in Kalilauge zu vermeiden, wird das Azotometer immer unter dem gleichen Druck gehalten.

Nach diesen Grundsätzen ist der in Abb. 2 gezeigte Apparat konstruiert[11,14]. Das Verbrennungsrohr mündet mit einem langen Schnabel direkt in das Quecksilber des Azotometers. Um Verunreinigung des Kohlendioxids durch das Hahnfett der Rohröffnung zu vermeiden, durch die die Substanz eingeführt wird, ist an dieser Stelle eine kleine capillare Öffnung angebracht, die immer etwas Kohlendioxid nach rückwärts ausströmen läßt. Von dem Hahnfett freiwerdender Stickstoff wird auf diese Weise hinausgespült, und kann die Analyse nicht stören. — Auch eine Methode zur Darstellung von reinem Kohlendioxid wurde verbessert[14]. Tab. 1 zeigt eine Serie von Analysen mit diesem Apparat.

Tabelle 1. *Analyse stickstoffhaltiger Verbindungen*

Nr.	Verbindung	Einwaage µg	Korrigierte Barometerablesung mm Hg	Temp. °C	Stickstoffvolumen µl		Stickstoffgehalt %		Abweichung %
					abgelesen	korrigiert	gefunden	berechnet	
1	*p*-Nitrobenzoesäure	172	754	29	13,3	13,0	8,50	8,38	+ 0,12
2	*p*-Nitrobenzoesäure	274	754	28	20,7	20,2	8,32	8,38	— 0,06
3	Cyanacetamid	106	754	27	31,6	30,8	32,89	33,33	— 0,44
4	3-Nitrophthalsäure	212	757	28	12,6	12,3	6,57	6,64	— 0,07
5	Cyanacetamid	274	757	28	81,6	79,4	32,80	33,33	— 0,53
6	Behenamid	94	757	28	3,7	3,6	4,35	4,12	+ 0,23
7	Cystin	106	757	29	11,0	10,7	11,39	11,66	— 0,27
8	Taurin	206	757	30	20,4	19,9	10,87	11,20	— 0,33
9	Taurin	136	757	28	13,4	13,1	10,89	11,20	— 0,31
10	Taurin	224	759	30	22,9	22,3	11,23	11,20	+ 0,03
11	*p*-Nitrobenzoesäure	115	759	30	9,0	8,8	8,63	8,38	+ 0,25
12	*dl*-Serin	278	759	31	33,7	32,8	13,26	13,33	— 0,07
13	4-Amino-5-bromo-4-methylpyrimidin	111	759	31	22,9	22,3	22,58	22,34	+ 0,24
14	Behenamid	85	761	32	3,3	3,2	4,25	4,12	+ 0,13
15	3-Nitrophthalsäure	178	761	32	10,7	10,4	6,56	6,64	— 0,08
16	Cyanacetamid	135	761	30	40,8	39,8	33,31	33,33	— 0,02
17	Cystin	248	762	28	25,8	25,1	11,53	11,66	— 0,13
18	*p*-Nitrobenzoesäure	362	763	31	27,5	26,8	8,36	8,38	— 0,02
19	Serin	288	763	29	34,2	33,7	13,30	13,33	— 0,03
20	Taurin	518	763	32	51,7	50,4	10,96	11,20	— 0,24
21	*p*-Nitrobenzoesäure	175	763	30	13,3	13,0	8,42	8,38	+ 0,04
22	*p*-Nitrobenzoesäure	241	759	29	18,4	17,9	8,40	8,38	+ 0,02

Standardabweichung $\sigma = 0{,}22\%$ absolut.

Diese Resultate sind ohne Zweifel gut. Leider ist der Apparat aber nur für die kleinen Substanzmengen verwendbar. Da er ungefähr die selbe Wartung erfordert wie ein großer Dumas-Apparat, ist er nur dann im Routinebetrieb lohnend, wenn man oft größere Serien von Ultramikroanalysen auszuführen hat. Sonst wird die für eine Analyse aufzuwendende Arbeit zu groß. — Wir verwenden deshalb für die Stickstoffbestimmung die unten beschriebene Simultanmethode für C-H-N.

Phosphorbestimmung

Die ultramikroanalytische Bestimmung von Phosphor ist seit langem colorimetrisch ausgeführt worden. Man verbrennt die Substanz und läßt die gebildete Phosphorsäure in saurer Lösung mit Molybdat reagieren. Die gebildete gelbe Phosphormolybdänsäure kann man entweder direkt in der wäßrigen Lösung zu Molybdänblau reduzieren und messen, oder man kann sie in ein organisches Lösungsmittel ausschütteln und in organischer Lösung reduzieren und die blaue Farbe messen.

Die Extraktionsmethode hat in der Ultramikroanalyse den Vorteil, daß man die zu messende Farbe in einem kleinen Volumen konzentrieren kann, und daß außerdem störende Substanzen entfernt werden. — Wir haben sehr lange Zeit große Schwierigkeiten mit Extraktionsmethoden gehabt, die oft zu tiefe Resultate ergaben, bis wir endlich die Ursache dieser Schwierigkeit erkannten[13]. In der wäßrigen Lösung liegt nämlich die Phosphomolybdänsäure in 2 Modifikationen vor, die sich miteinander im Gleichgewicht befinden[4,5], einer gelben und einer farblosen. Nur die gelbe Modifikation wird von Octylalkohol und Amylacetat extrahiert. Bei tieferen Temperaturen liegt hauptsächlich die farblose Modifikation vor, während mit steigender Temperatur wachsende Mengen der gelben Modifikation gebildet werden. — Um eine quantitative Extraktion zu erhalten, muß man deshalb bei genügend hoher Temperatur extrahieren — und zwar mindestens bei 25°C. Durch die Extraktion der gelben Modifikation wird das Gleichgewicht in der wäßrigen Phase fortwährend gestört, und die farblose Modifikation geht in die gelbe Modifikation über und wird dann extrahiert. Da dies eine gewisse Zeit dauert, soll man etwa 10 min lang unter kräftigem Schütteln extrahieren.

Die Verbrennung kann man bei den meisten Substanzen gut in einem kleinen Kjeldahl-Kölbchen in Schwefelsäure-Salpetersäure-Perchlorsäuremischung vornehmen. Verbrennt man im Bombenrohr, so muß man der Schwefelsäure Wasser zumischen[13]. Nach Zusatz von Natriummolybdat extrahiert man dann am besten mit einem gemessenen Volumen von Amylacetat. Die Löslichkeit von Amylacetat in der Wasserphase kann vernachlässigt werden. Die 1. Extraktion ist quantitativ. Man kann dann gleich die gelbe Farbe der Lösung messen. Dies ist sehr bequem, da man die Lösung aus dem Gefäß direkt in die Küvette pipettieren kann.

Reduktion zu Molybdänblau gibt jedoch eine größere Empfindlichkeit. Einige Ergebnisse der Versuche über diese Phosphorbestimmungsmethoden[4] sind in Tab. 2 enthalten. — Kieselsäure stört nicht. Arsen(V) stört,

Tabelle 2. *Analyse phosphorhaltiger Verbindungen*

Verbindung	Einwaage mg	% Phosphor gefunden					berechnet %
		mit Hilfe der gelben Phosphormolybdänsäure			nach der Molybdänblau-Methode		
		400 nm	430 nm	460 nm	A 720 nm	B 710 nm	
Naßveraschung							
Ammonium-phosphat	0,851				23,5	23,5	23,46
	0,851				23,6	23,5	23,46
Histamin-diphosphat	18,87			20,0			20,17
Tri-*n*-butyl-phosphat	38,77			11,54			11,63
	33,48			11,62			11,63
Trikresylphosphat	38,97			8,49	8,43	8,42	8,41
	40,38			8,49	8,52	8,41	8,41
	42,80			8,42			8,41
	40,51			8,40			8,41
	3,970	8,40					8,41
	6,618		8,41				8,41
Triphenylphosphat	40,41			9,53			9,51
	42,09			9,49			9,51
	2,467				9,50	9,49	9,51
	2,443				9,51	9,52	9,51
	3,752	9,47					9,51
	6,254		9,38				9,51
Triphenylphosphin	1,998				11,66	11,49	11,81
	1,998				11,92	11,74	11,81
	37,72			11,82			11,81
	39,89			11,74			11,81
	31,57			11,64			11,81
	31,57			11,70			11,81
Aufschluß im Bombenrohr							
Triphenylphosphin	0,0350				11,65		11,81
	0,0246				11,98		11,81
	0,0287				11,67		11,81
Triphenylphosphat	0,0291				9,21		9,51
	0,0286				9,54		9,51
	0,0235				9,06		9,51

die Störung kann aber nach PETT[18] durch Reduktion zu Arsen(III) beseitigt werden. In dieser Richtung haben wir keine Versuche unternommen.

Gleichzeitige Bestimmung von Kohlenstoff, Wasserstoff und Stickstoff

Prinzip der Methode. Die Substanz wird neben einer geringen Katalysatormenge und einer kleinen Menge Kupfer in ein kleines Quarzrohr eingebracht. Das Rohr wird mit ganz reinem Sauerstoff ausgespült und abgeschmolzen. Es wird darauf auf 700° C erhitzt, wobei die Substanz verbrannt wird. Etwa vorhandene andere Elemente wie Schwefel, Halogene, Phosphor oder Alkali werden von dem Katalysator gebunden, und der Überschuß an Sauerstoff wird durch das Kupfer gebunden. In vergasbarem Zustand befinden sich also dann nur Kohlendioxid, Wasser und Stickstoff von der Substanz im Rohre. — Diese werden nach Öffnen des Rohres durch eine Kombination gasvolumetrischer und manometrischer Methoden gemessen.

Reagentien. *Verbrennungskatalysator.* 10 g des Zersetzungsproduktes von Silberpermanganat[16] werden mit 20 g geschmolzenem, granuliertem Bleichromat (für die Elementaranalyse) im Mörser fein zusammengemahlen. — *Kupfer.* Kupferdrahtnetz (für die Elementaranalyse, Drahtdurchmesser etwa 0,15 mm, 18 Drähte je Zentimeter) wird kurz im Eisessig erhitzt und mehrere Male mit Wasser ausgekocht. Es wird in einem Quarzrohr getrocknet und im Luftstrom 5 min lang auf 500° C erwärmt. Das oberflächlich oxydierte Netz wird dann 20 min lang im Stickstoffstrom auf 800° C erhitzt und unter Stickstoff erkalten gelassen. Es wird in einem sauberen Reagensglas mit Glasstopfen aufbewahrt. Es ist am besten, einen größeren Vorrat in Form einer fest gewickelten Rolle auf einmal herzustellen. — *Quarzwolle.* Heraeus Hanau. Die Wolle wird in einem Quarzrohr im Sauerstoffstrom 30 min lang auf 800° C erhitzt und dann in einem sauberen Reagensglas mit Glasstopfen aufbewahrt.

Ausführung. Wie Abb. 3 zeigt, wird das Verbrennungsrohr auf ein waagerechtes Gestell gelegt, in das die Substanz *R* bis zum Ende des Rohres eingebracht wird. 100 mg Katalysator werden dann im Abstand von 10 cm von der Substanz eingelegt. Das Rohr wird dann leicht geklopft, so daß der Katalysator flach zu liegen kommt und den Raum darüber frei läßt. Das Rohr kommt nun in die Füllvorrichtung. Es wird, wie Abb. 3 zeigt, über die Capillare *W* geschoben, durch die elektrolytisch erzeugter, reiner Sauerstoff mit einer Geschwindigkeit von etwa 5 ml/min in das Rohr strömt. Die Austrittsöffnung der Capillare liegt seitlich (Abb. 3, 7), um zu verhindern, daß der Sauerstoff direkt auf die Substanz geblasen wird. — Die Öffnung der Capillare liegt im Abstand von 60 mm von der Substanz. — Eine kleine Blechschachtel wird nun über das Ende des Rohres geschoben und mit Kohlensäureeis gefüllt (Abb. 3, 2). Die Kühlung soll etwaige Substanzverluste infolge von Flüchtigkeit beim folgenden Ausspülen mit Sauerstoff verhindern. — Nach 1 min wird das Verbrennungsrohr nach rechts geschoben, so daß das Capillarenende 4 cm von der Substanz entfernt ist (Abb. 3, 3); es wird 4 min so stehen gelassen. Während dieser Zeit werden 50 mg Kupfernetz — in Form eines Rohres gerollt — und ein Bausch Quarzwolle mit einem dünnen Stahlstab in das Verbrennungsrohr eingeführt und so dicht wie möglich an den Katalysator herangeschoben. — Das Verbrennungsrohr wird nun wieder nach links gezogen, so daß das Ende der Capillare 60 mm von der Substanz entfernt ist, und der Klappofen *Y* wird von der Seite her über das Verbrennungsrohr gezogen. Katalysator, Kupfer und Quarzwolle werden auf diese Weise gelinde ausgeglüht, und eventuelle Verunreinigungen werden vertrieben. Das Kupfer wird oberflächlich oxydiert. Nach 5 min wird der Ofen zurückgeschoben. Das Verbrennungsrohr wird nach links

gezogen und so nahe wie möglich an der Quarzwolle abgeschmolzen. Die Abschmelzspitze soll lang, schmal und gerade sein, um das später folgende Abbrechen zu erleichtern. — Das Rohr wird nun etwas schräg gehalten, mit der Substanz nach unten, und um seine Längsachse gedreht. Dabei gleitet der Katalysator nach links über die Substanz und mischt sich mit ihr. Teile des Katalysators bleiben hängen und „benetzen" die Rohrwand. — Das Rohr wird dann in einen Ofen bei 700° C eingelegt. Nach 1 Std wird der Ofen abgeschaltet und das Rohr wird im Ofen langsam erkalten gelassen. — Der Verbrennungsvorgang ist dann abgeschlossen, worauf nun die Verbrennungsprodukte gemessen werden sollen.

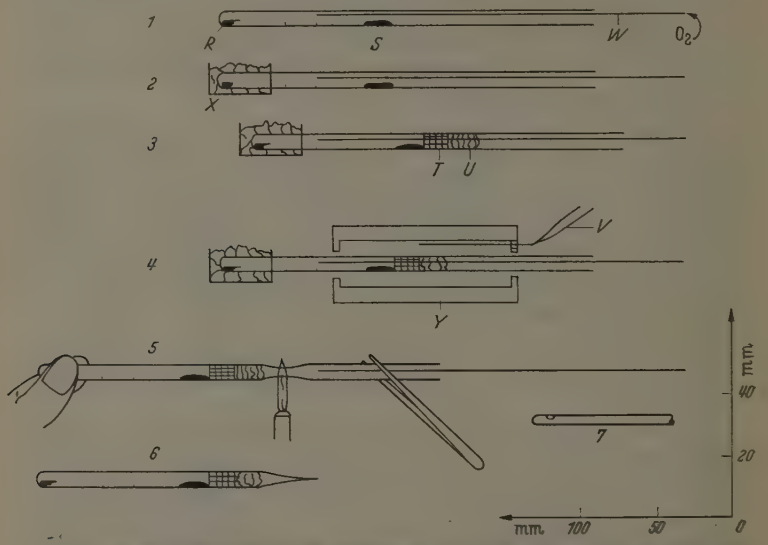


Abb. 3. *Füllen und Abschmelzen des Verbrennungsrohres.* *1* Quarzrohr, 6,0 mm Außendurchmesser, 0,6—1 mm Wanddicke, Länge 20 cm; *R* Schiffchen aus Platin mit Substanz; *S* 100 mg Katalysator; *W* Capillare aus rostfreiem Stahl. *2* Ausspülung und Kühlung des Rohres. *3* Ausspülung der letzten Stickstoffreste und Einsatz von Kupfer *T* und Quarzwolle *U*. *4* Ofen *Y*, 500° C, wird über das Rohr gezogen. *V* Thermoelement. *5* Abschmelzen des Rohres. *6* Das fertige Rohr für die Verbrennung. *7* Ende der Capillare *W* mit seitlicher Öffnung

Für die Messung wird der in Abb. 4 gezeigte Apparat benützt. Die heute verwendete Form der Hähne zeigt Abb. 5. Das Rohr *E*, welches aus Quarz besteht, wird vom Apparat abgenommen und das Verbrennungsrohr wird hineingelegt. Alle Schliffe des Apparates werden mit einem guten Hochvakuumfett gefettet. Das Rohr wird nun wieder am Apparat befestigt, und der Apparat wird durch die Hähne *G*, *H* und *W* evakuiert. Durch Drehen des Rohres *E* auf seinem Schliff wird es dann geschlossen, und das Niveaugefäß wird so gestellt, daß das darin befindliche Quecksilber bis dicht unter die genannten 3 Hähne steigt. Die Hähne werden nun geschlossen, das Quecksilber wird wieder bis unterhalb von Rohr *E* sinken gelassen, Rohr *E* wird durch Drehen geöffnet und nach einer Weile wieder geschlossen. Durch 3maliges Senken und Steigenlassen des Quecksilbers und Abpumpen restlicher Luft wird der Apparat quantitativ luftfrei gemacht. Vor dem letzten Abpumpen

wird Rohr *E* mit dem Verbrennungsrohr 10 min lang auf 550° C erwärmt, um vergasbare Verunreinigungen zu entfernen. Beim letzten Auspumpen und Heben des Niveaugefäßes läßt man dann das Quecksilber durch die Hähne steigen und schließt sie. Nun senkt man das Niveaugefäß langsam und vibriert dabei die gebogenen Teile der Rohre *U* und *V* vorsichtig gleichzeitig mit einem Massageapparat. Das Quecksilber reißt genau an der höchsten Stelle (siehe Abb. 5) ab, eine Quecksilberschicht bleibt oberhalb des Hahnkükens stehen und hindert jede Diffusion von Gasen in das oder aus dem Hahnfett. Der Quecksilberspiegel im Apparat wird nun dicht unter Rohr *E* eingestellt, und durch einen unten beschriebenen Drehmechanismus (Abb. 6) wird die Spitze des Verbrennungsrohres abgebrochen. Rohr *E* wird nun mit einem kleinen Ofen auf 550° C erwärmt. Dicht unter der Gradierung des Meßrohres *C* befindet sich eine kleine Ausfriertasche (Abb. 7), in der nun das Wasser und das Kohlendioxid mit flüssigem Sauerstoff ausgefroren werden. Nach etwa 10 min ist das Ausfrieren beendet. Rohr *E* wird nun durch Drehen geschlossen und der Quecksilberspiegel wird bis dicht unter die Ausfriertasche erhöht. Anschließend nimmt man den flüssigen Sauerstoff weg und läßt die Gase auftauen. Man kann die Ausfriertasche mit einem warmen, feuchten Lappen etwas wärmen. Darauf erhöht man den Quecksilberspiegel, bis der Druckunterschied zwischen dem Meßrohr und dem Vergleichs-

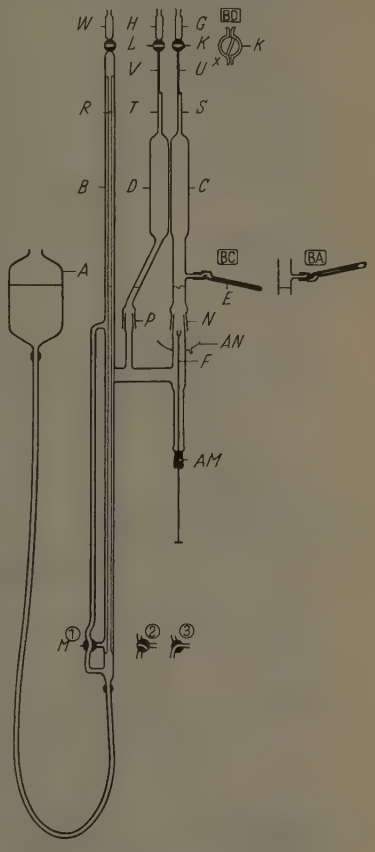


Abb. 4. *Der Meßapparat.* *A* Niveaugefäß mit Quecksilber, motorgetrieben 1,5 l Inhalt. *B* Entgasungsrohr für Quecksilber. *C* Gradiertes Meßrohr. Weiter Teil Länge 20 cm, Vol. 200 ml. *D* Vergleichsrohr, ungradiert, aber die gleichen Ausmaße wie *C*. *E* Seitenrohr aus Quarz für Aufnahme des Verbrennungsrohres. *F* Gabel an *veraltetem* Apparat. Wird nicht mehr verwendet. *G*, *H* Normalschliffbehälter, Volumen ~ 10 ml. *K*, *L* Hochvakuumhähne. *M* Kräftig dimensionierter Dreiwegehahn. Lichte Weite 5 mm. *N* Kräftiger Normalschliff 34,5/45. *P* Normalschliff 29. *R* Steigrohr für Quecksilber. *S*, *T* Meß- und Vergleichsrohr für *C* + *N*, Länge 15 cm, Vol. 2,0 ml. *U*, *V* Meß- und Vergleichsrohr für *N*, Länge 15 cm, Vol. 0,25 ml. *W* = *G* und *H*

rohr etwa 10—12 mm beträgt. — Beim Erhöhen des Quecksilberspiegels hat man immer Hahn *M* in Stellung 2, so daß das Quecksilber durch Steigrohr *R* in den Apparat kommt. Es fällt dann in dem evakuierten Raum zwischen den Rohren *R* und *B* herunter und wird effektiv entgast. Beim Senken dreht man den Hahn in Stellung 1 oder 3. Für die nun folgende Messung des Gasdruckes stellt man den Hahn in Stellung 2. Jede direkte Berührung zwischen dem im Meßraum befindlichen Quecksilber und dem Niveaugefäß oder Schlauch muß nämlich vermieden werden, da sonst geringe Druckschwankungen, wie sie durch einen Windstoß gegen das

Fenster oder durch das Öffnen einer Tür entstehen, die Messung unsicher machen würden. Man mißt nun den Druckunterschied zwischen dem Vergleichsrohr und dem Meßrohr mit einem Meßmikroskop auf 0,01 mm, sowie die Temperatur und das Gasvolumen im Meßrohr, wobei man das Totvolumen zwischen dem Quecksilber am Hahn und dem Gradierungsnullpunkt abschätzt.

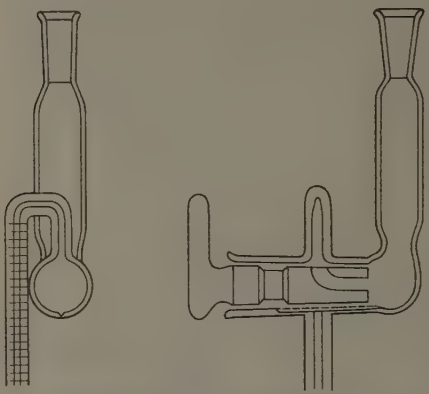


Abb. 5. *Hochvakuumhahn für den Meßapparat.* An Stelle von *K* und *L* in Abb. 4. Die Rinne im Küken wird mit Quecksilber gefüllt und verhindert Diffusion der Außenluft in den Apparat. Über dem Hahn bleibt im gebogenen Rohrteil Quecksilber stehen

Anschließend hebt man das Niveaugefäß weiter, bis sich der Quecksilberspiegel im Meßrohr beim Übergang zu dem nächstschmalen Teil befindet. Dann öffnet man den Hahn *K* am Meßrohr vorsichtig und läßt das Quecksilber langsam bis zum Gradierungsnullpunkt vorrücken. Der Hahn wird dann wieder geschlossen. Hahn *L* wird nun geöffnet, und das Niveaugefäß wird so eingestellt, daß sich die Quecksilbermenisken im Meßrohr und im Vergleichsrohr in gleicher Höhe befinden. Hahn *M* wird in Stellung 1 gedreht. Falls etwas Quecksilber im Hahnküken *L* hängen bleibt, wird dies durch kurzes Hineinblasen und Saugen mit einem Stück Gummischlauch in Gefäß *H* beseitigt. Man stellt die Höhe der Menisken nicht ganz genau gleich ein, da dies sehr schwierig ist. Ein geringer Höhenunterschied wird mit dem Meßmikroskop gemessen und dann zu dem Barometerdruck hinzu- oder von ihm abgerechnet. Temperatur, Barometerdruck und Gasvolumen werden nun gemessen.

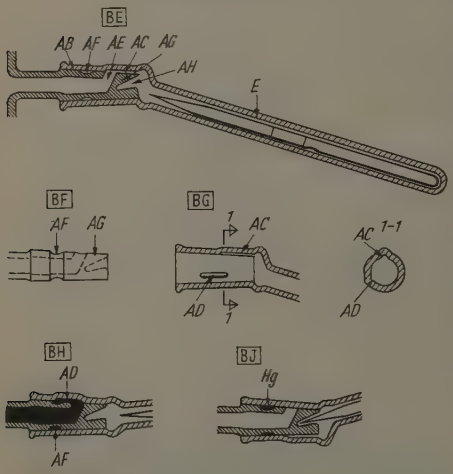


Abb. 6. *Seitenrohr für das Verbrennungsrohr.* Das Rohr, mit dem Verbrennungsrohr *E* wird in Lage *BE* auf dem gefetteten Schliff befestigt. Es ist durch die Rinne *AC* mit dem Inneren des Apparates verbunden. Nach dem ersten Evakuieren wird das Rohr in Stellung *BH* gedreht, und das Quecksilber im Apparat wird steigen gelassen. Es steigt durch Rinne *AD* in die runde Rinne *AF*, die als Quecksilberverschluß die Diffusion von Außenluft in den Apparat verhindert. Nach dem endgültigen Evakuieren wird das Rohr in Stellung *BJ* gedreht und mit einem Bleistift leicht geklopft. Das Verbrennungsrohr gleitet nun in das Loch *AH*. Wenn nun Rohr *E* wieder in die Stellung *BE* gedreht wird, bricht die Spitze des Verbrennungsrohres ab, und die Gase können durch Rinne *AC* in den Apparat entweichen

Dann werden etwa 3 ml 50%ige Kalilauge in den Behälter *G* einpipettiert. Man überzeugt sich davon, daß keine Luftblasen an der Berührungsfläche zwischen Quecksilber und Lauge hängen. Sind solche da, so werden sie mit einer Pipette mit Gummischlauch weggesaugt. — Nun senkt man den Quecksilberspiegel etwa 3 cm, öffnet vorsichtig Hahn *K* und läßt langsam das Quecksilber und die Lauge in das Meßrohr hinunterlaufen. An der Erweiterung von Rohr *U* zu Rohr *S* laufen Quecksilber und Lauge an dem Gas vorbei. Der Hahn *K* wird nun geschlossen. Die Lauge absorbiert die Kohlensäure, und der übrigbleibende Stickstoff sammelt sich an der Verbindungsstelle zwischen den Rohren *S* und *U*. Nun hebt man das Quecksilberniveaugefäß wieder etwas und läßt den Stickstoff durch vorsichtiges Öffnen von Hahn *K* in die Capillare *U* steigen. Hahn *K* wird wieder geschlossen. Die Quecksilberspiegel im Meßrohr und im Vergleichsrohr werden auf gleiche Höhe eingestellt. Nach 20 min Stehen wird das Stickstoffvolumen in Rohr *U* gemessen. Temperatur, Barometerdruck und Höhe der Laugensäule im Meßrohr zwischen Queksilber und Stickstoff werden gemessen. — Der Druck der Laugensäule wird bei der Berechnung vom gemessenen Barometerdruck abgezogen.

Die Hähne *K* und *H* werden nun geöffnet und der Quecksilberspiegel wird so gesenkt, daß sich die Lauge im Meßrohr dicht über dem Schliff *N* befindet. Nun werden erst Rohr *E* und dann das Meßrohr abgenommen. Die Rohre werden sofort mit warmem Wasser und Aceton gereinigt, und das Innere von Schliff *N* wird mit feuchtem Filtrierpapier gut ausgewischt. Der Apparat ist nun für die nächste Analyse bereit.

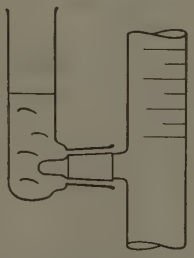


Abb. 7. *Ausfriertasche.* Der Behälter wird mit der gut mit Siliconfett gefetteten Schliffhülse auf den Schliffkern gesteckt und mit flüssiger Luft gefüllt. Die Gase werden dann in dem geschlossenen Kernteil ausgefroren. Nach dem Ausfrieren wird der Behälter auf dem Schliff gedreht, so daß die flüssige Luft herausläuft, und alles wird etwas erwärmt

Bei der Berechnung der Analyse beginnt man mit dem Stickstoffwert, der auf die bei der Stickstoffbestimmung nach Dumas übliche Weise berechnet wird. Der beim Ausfrieren in Rohr *E* verbleibende Teil des Stickstoffs wird aus den Volumen- und Temperaturverhältnissen des Apparates berechnet und zu dem gemessenen Volumen hinzugerechnet. Dann korrigiert man die in der 2. Messung erhaltene Gasmenge Kohlendioxid + Stickstoff für den Dampfdruck des Wassers und zieht die unkorrigierte Stickstoffmenge ab. Man erhält so das Kohlendioxid. Die für den Wasserdampfdruck korrigierte Menge Kohlendioxid + Stickstoff zieht man dann vom Resultat der 1. Messung ab und erhält das Wasser.

Eine Reihe Analysen, die in direkter Folge mit der Methode ausgeführt wurden, werden in Tab. 3 gegeben. Die Analysenserie wurde im Sommer 1959 ausgeführt. Die Methode wurde dann in Routinebetrieb genommen und funktionierte ungefähr ein halbes Jahr lang ausgezeichnet. Auch mit phosphorhaltigen Substanzen wurden gute Resultate erhalten. — Dann wurden die Wasserstoffwerte plötzlich viel zu tief, und auch die Kohlenstoffwerte wurden etwas zu tief, so daß es

notwendig wurde, einen empirischen Faktor 1,025 für den Kohlenstoff und 1,25 für den Wasserstoff zu benützen.

Durch Diskussionen mit Prof. BELCHER und Dr. SIMON anläßlich der Tagung in München und durch weitere Versuche wurde die Ursache der Fehler inzwischen weitgehend geklärt. Ein wenig Wasser wird an den Wänden des Verbrennungsrohres,

Tabelle 3. *Analyse fester, nichtflüchtiger Verbindungen*

Nr.	Verbindung	Einwaage µg	Kohlenstoff		Wasserstoff		Stickstoff	
			gefunden %	berechnet %	gefunden %	berechnet %	gefunden %	berechnet %
1	Laurinsäure	687,56	71,8	71,9	11,9	12,1	0,0	0,0
2	Laurinsäure	623,54	71,9	71,9	12,1	12,1	0,0	0,0
3	$C_{30}H_{48}O$	785,91	85,0	84,8	11,2	11,4	0,0	0,0
4	$C_{30}H_{48}O$	599,30	84,6	84,8	11,3	11,4	0,0	0,0
5	Chlordinitrobenzol	517,87	36,3	35,6	1,5	1,5	14,0	13,9
6	Dimer-dithioacetyl-aceton	721,84	45,9	45,4	6,1	5,8	0,0	0,0
7	Kaliumhydrogen-phthalat	607,07	47,1	47,1	2,7	2,5	0,0	0,0
8	Acetanilid	672,66	71,2	71,1	6,8	6,7	10,8	10,4
9	Kaliumhydrogen-phthalat	569,87	47,2	47,1	2,6	2,5	0,0	0,0
10	Acetanilid	663,14	71,1	71,1	6,8	6,7	10,3	10,4
11	n-1-Brombehensäure	498,38	63,1	63,4	10,2	10,3	0,0	0,0
12	o-Chlorbenzoesäure	627,57	53,9	53,7	3,3	3,2	0,0	0,0
13	Benzoesäure	592,99	68,6	68,8	5,0	5,0	0,0	0,0
14	Trijodphenol	605,07	15,8	15,3	1,0	0,6	0,0	0,0
15	n-1-Brombehensäure	677,33	62,3	62,9	10,5	10,3	0,0	0,0
16	p-Nitrobenzoesäure	455,45	49,6	50,3	3,0	3,0	8,5	8,4
17	Acetanilid	606,20	70,3	71,1	6,6	6,7	10,6	10,4
18	Sulfanilsäure	684,46	41,9	41,6	4,0	4,1	9,0	8,1
19	Thioharnstoff	644,04	15,9	15,8	4,7	5,3	36,5	36,8
20	Trijodphenol	674,53	15,30	15,3	0,9	0,6	0,0	0,0

des Seitenrohres *E* und vor allem des Meßrohres adsorbiert, und ein wenig Kohlendioxid dort vielleicht auch chemisch gebunden (Ionenaustausch). — Die Vergrößerung der Fehler nach längerem Gebrauch des Apparates hat wahrscheinlich ihre Ursache darin, daß die Innenwand des Meßrohres von der Lauge angegriffen wurde, wodurch die Oberfläche vergrößert und aktiviert wurde. Supremaxrohr scheint weniger zu adsorbieren als Quarzrohr.

Das Quarzverbrennungsrohr wurde nun durch Supremaxrohr ersetzt. Das Seitenrohr *E* wurde mit Fluorwasserstoffsäure gereinigt und dann in der Wasserstoff-Sauerstofflamme so geglüht, daß eine ganz glatte Innenoberfläche erhalten wurde. Weiter wurde das Seitenrohr mit einer 3 cm langen capillaren Verlängerung versehen (Innendurchmesser etwa 1 mm, Außendurchmesser 8 mm). Nach jeder Analyse wird das Meßrohr mit Äther, Alkohol, Wasser, 5n Salzsäure, Alkohol und Äther gewaschen, wodurch die ionenaustauschende Innenfläche in eine (salz)saure Form übergeführt wird.

Vor dem Abbrechen des Verbrennungsrohres wird die capillare Verlängerung des Rohres *E* mit flüssigem Sauerstoff gekühlt. Dann wird Rohr *E* nur so weit gedreht, daß das Verbrennungsrohr bricht, daß aber die Verbindung zum Meßrohr noch nicht geöffnet wird. — Nach 5 min öffnet man dann diese Verbindung. Jetzt sind Kohlendioxid und Wasser in der Capillare ausgefroren, und der Stickstoff strömt in den Meßraum, wo er ohne Verwendung von Lauge gemessen werden kann. Er wird dann abgepumpt, und nachdem Kohlendioxid und Wasser aufgetaut und auf die oben beschriebene Weise in den Meßraum übergeführt wurden, können sie wie oben beschrieben gemessen werden.

Die Wasserstoffwerte sind jetzt nur ungefähr 0,5% (absol.) zu tief, und sie kommen durch Hinzurechnen der entsprechenden Wassermenge innerhalb der konventionellen Fehlergrenzen zu liegen. Ebenso sind die unkorrigierten Kohlenstoffwerte durchschnittlich nur 0,4% zu tief. — Wir werden innerhalb der nächsten Wochen einen neuen Meßapparat mit unverletzter Glasoberfläche erhalten und hoffen dann wieder ganz ohne empirische Faktoren arbeiten zu können.

Der Apparat hat den Vorteil, daß er während Ruheperioden keinerlei Wartung braucht. Wenn man dann eine Analyse ausführen will, braucht man nicht erst eine Serie Testanalysen vorher laufen zu lassen, um den Apparat ins Arbeitsgleichgewicht zu bekommen. — Dies ist im Routinelaboratorium besonders dann ein Vorteil, wenn man nur ab und zu eine oder einige Analysen auszuführen hat. Hat man jedoch immer große Analysenserien durchzuführen, so ist die Methode wirtschaftlich nicht so vorteilhaft, da man nur etwa 3 Analysen in 2 Tagen ausführen kann. — In diesem Falle ist die von UNTERZAUCHER[20–22] beschriebene Methode vielleicht günstiger.

Viele biochemisch wichtige Substanzen sind hygroskopisch. Die Einwaage solcher Substanzen war deshalb von großer Bedeutung. Nach einer Anzahl Versuche kamen wir zu folgender Methode (vgl. Abb. 8).

Die Substanz wird in ein kleines Quarzgefäß *C* mit Normalschliff (Gewicht etwa 150 mg, Hersteller: Heraeus, Hanau) eingewogen. Das Gefäß wird in den Metallhalter *D* gelegt. Drei solche Gefäße haben darin Platz. Der Stopfen liegt lose im Schliff und die 3 Metallstäbe *E* werden so in den Halter eingelegt, daß sie die Schliffstopfen nicht oder kaum berühren. Der Halter wird nun in die Trockenpistole *G* eingelegt, und diese ist während der Trocknung durch Seitenrohr *K* mit einer Hochvakuumpumpe verbunden. Nach dem Trocknen wird Hahn *K* geschlossen. Die Pistole wird, mit dem Pistolenrohr *G* etwas nach unten geneigt, leicht auf die Tischplatte gestoßen. Die Metallstäbe *E* gleiten dann nach vorn und pressen die Stopfen der Röhrchen fest in die Schliffe. Nun wird die Capillare *N* mit einem Schlauchstück auf das Seitenrohr *K* gesteckt und Hahn *K* wird geöffnet. Die Außenluft strömt nun durch das Trockenrohr *Q* in die Pistole ein. Die Pistole wird darauf mindestens 30 min ins Wägezimmer gelegt, wobei das Pistoleninnere mit der Außenluft durch die Capillare *N* in Verbindung bleibt. Auf diese Weise werden auch die Röhrchen *C* mit trockener Luft gefüllt, da die ungefetteten Schliffe ja nicht luftdicht sind. Die Pistole wird nun geöffnet und die Röhrchen *C* werden gewogen. Diese Trocknungs- und Wägungsmethode hat sich in unserem Labor als so praktisch erwiesen, daß wir sie — mit etwas größeren Röhrchen — auch für die normale Mikroanalyse benützen.

Nach der Wägung wird das Röhrchen geschlossen in das Verbrennungsrohr für die Analyse eingebracht. Der Verbrennungskatalysator wird zugegeben und das

Röhrchen wird genau wie bei einer gewöhnlichen Analyse mit Sauerstoff ausgespült und erhitzt. Das Öffnen der Röhrchen wird durch Abb. 9 erläutert. Während das Verbrennungsröhrchen noch im Ofen liegt und von Sauerstoff durchströmt wird,

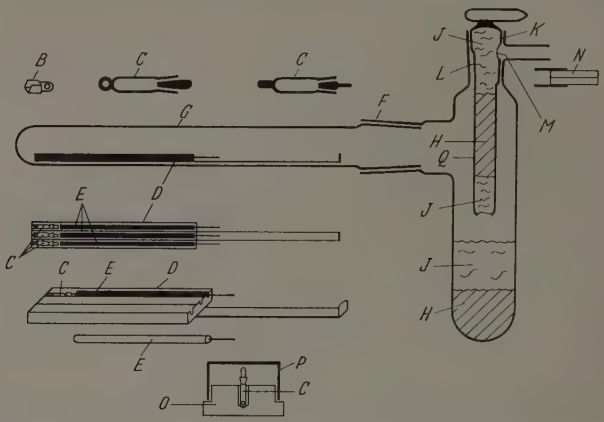


Abb. 8. *Einwägeapparate und Trockenapparat für hygroskopische Substanzen.* *B* Platinwägeschiffchen 3×3×3 mm; *C* Quarzwägeröhrchen, Gewicht ~ 150 mg, normalgeschliffen Heraeus, Hanau; *D* Metallhalter für Wägeröhrchen; *E* Messingstäbe; *F* Schliff der Trockenpistole; *G* Pistolenrohr; *H* Magnesiumperchlorat; *J* Glaswolle; *K* Hochvakuumhahn; *L* Rinne in Hahnküken zum Direktevakuieren; *M* Öffnung in Hahnküken; *N* Feine Capillare; *O* Metallblock als Gestell für *C*; *P* Glasglocke; *Q* Trockenrohr

hält man einen Vibrator von unten gegen sein geschlossenes Ende und drückt mit dem Finger von oben dagegen. Nach ungefähr $^1/_2$ sec Vibration fliegt der Stopfen aus dem Röhrchen. Der restliche Stickstoff wird nun aus dem Rohre herausgespült und es wird wie vorher beschrieben verschlossen.

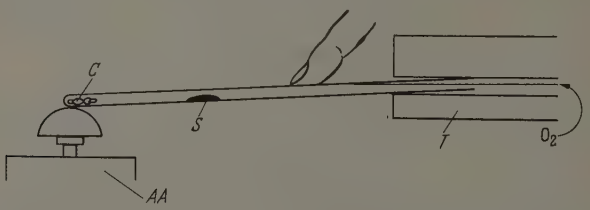


Abb. 9. *Öffnen des Wägeröhrchens.* *AA* Massagevibrator; *C* Wägeröhrchen mit Substanz; *S* Verbrennungskatalysator; *T* Ofen, 500° C

Wir haben bisher nur eine hygroskopische Substanz auf diese Weise analysiert, nämlich „Oxaditon", eine quaternäre Ammoniumbase. Die Resultate waren:

C: gef. 48,8% ber. 48,8%
H: gef. 8% ber. 8,1%
N: gef. 5,4% ber. 5,1%.

Zum Erwärmen der Trockenpistolen verwenden wir den in Abb. 10 gezeigten Trockenblock. Er besteht aus einer Anzahl Metallrohren mit quadratischem Querschnitt, die zwischen 2 dicken Aluminiumplatten eingeklemmt sind. Asbesteinlagen liegen zwischen den Rohren. Die Aluminiumplatten werden am linken Ende elektrisch geheizt. Am rechten Ende befindet sich eine Kühlzelle, die von Leitungswasser durchströmt wird. Die Berührungsfläche zwischen Wasser und Metall ist gering, so daß der Kühleffekt von der Strömungsgeschwindigkeit des Wassers praktisch unabhängig ist. — Man erhält so einen Temperaturgradient von + 150 bis + 35° C und kann jede beliebige Trocknungstemperatur für seine Substanz wählen.

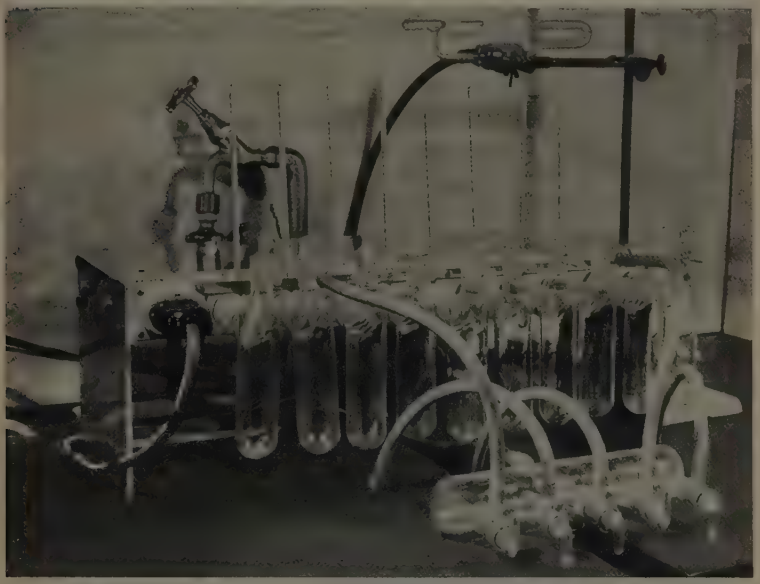


Abb. 10. *Wärmeblock mit Trockenpistolen.* Im Vordergrund Vakuumverteilerrohr, oben Vakuskop

Zur Erhaltung großer Sicherheit kann man die Heizung durch einen Energieregulator steuern. Will man einen geringen Temperaturgradienten haben, so kann man das Kühlwasser abstellen und bekommt so eine Differenz von etwa 30° C zwischen den Extremtemperaturen. Vor dem Trockenblock liegt ein Verteilerrohr, mit dem man 5 Pistolen gleichzeitig an die Vakuumpumpe anschließen kann.

Für die Manipulation der kleinen Schiffchen und Röhrchen benützen wir Probenexcisionszangen, wie sie in Abb. 11 gezeigt werden. Diese sind von Firmen für chirurgische Instrumente (z. B. Kifa, Stockholm) in verschiedenen Größen erhältlich und erlauben es leicht, Schiffchen oder andere kleine Gegenstände in schmale Röhrchen, Kjeldahl-Kolben usw. einzuführen. Wir benützen auch in der normalen Mikroanalyse jetzt Schiffchen und solche Zangen an Stelle von Mikrowägeröhrchen. Die Einwaagen gehen so schneller und werden genauer.

Als wir anfingen, die Ultramikromethoden ernstlich in unseren Routinebetrieb einzuführen, war gerade eine gute Quarzfadenwaage in den Handel gekommen, so

daß wir uns deshalb nicht mit dem schwierigen Problem der Herstellung einer solchen Waage beschäftigen mußten. Die von uns benützte Waage ist von der

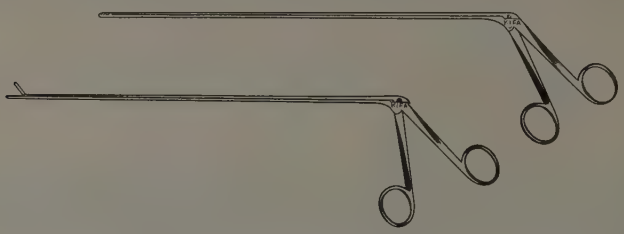


Abb. 11. *Probenexcisionszangen.* Die Zangen sind in verschiedenen Größen erhältlich, bis zu 2 mm Gesamtdurchmesser des langen Teiles bei 30 cm Länge. (Mit frdl. Erlaubnis von Kifa, Stockholm)

Microtech Services Co. 775 Sunshine Drive, Los Altos, Calif. geliefert. Die Außenansicht wird in Abb. 12 gezeigt. Die Waage arbeitet sehr schnell, gibt eine Genauigkeit von 0,1 μg und kann mit 200 mg belastet werden. Bei der Einwaage hygroskopischer Substanzen in den vorher beschriebenen Quarzröhrchen hatten wir zunächst mit elektrischen Aufladungen Schwierigkeiten. Diese wurden jedoch durch Einbauen einer schwach radioaktiven Substanz in die Waagschalenräume vollkommen beseitigt. Ganz neuerdings hat auch die Fa. Mettler eine Ultramikrowaage in den Handel gebracht.

Abb. 12. *Ultramikrowaage.* (Mit frdl. Erlaubnis von Microtech Services Co., Los Altos, Calif.)

Im vorhergehenden habe ich unter anderem eine Anzahl spektrophotometrische Methoden beschrieben. Trotz der großen Empfindlichkeit dieser Methoden benützen viele Analytiker lieber titrimetrische oder gravimetrische Methoden, weil diese oft genauer sind. Man kann aber auch mit spektrophotometrischen Methoden für die Elementaranalyse genügend gute Resultate erhalten, wenn man sich bei der Absorptionsmessung auf einem günstigen Gebiet der Standardkurve hält, und wenn man andere Fehlerquellen zu vermeiden sucht. Eine Fehlerquelle, die von Instrumentfirmen und Laboratorien oft grob vernachlässigt wird, ist

der Temperaturfaktor. Die meisten organischen Lösungsmittel haben hohe Temperaturausdehnungskoeffizienten, und die Ausdehnung allein kann schon wesentliche Fehler verursachen. Dazu kommt, daß viele colorimetrische Reaktionen temperaturabhängige Gleichgewichtsreaktionen sind. Um genaue Resultate zu erhalten, haben wir das Spektrophotometer in einem thermostatierten Zimmer aufgestellt. Außerdem ist es selbst noch auf die gleiche Temperatur thermostatiert, um Erwärmungen durch die Lampe zu vermeiden.

Um die zu messende Absorption in einer günstigen Grenze zu halten, kann man die Lösung konzentrieren oder verdünnen. Dies ist bei den Extraktionsmethoden, wie z. B. bei der Phosphorbestimmung und der Schwefelbestimmung möglich. In anderen Fällen kann man sich dadurch helfen, daß man in verschieden langen Küvetten mißt. In der Ultramikroanalyse hat man aber oft nur geringe Volumina schwach gefärbter Lösungen.

Wir haben deshalb zu unserem Beckman DU Spektrophotometer eine Anordnung gebaut[15], die es ermöglicht, in Küvetten verschiedener Schichtlänge, auch solchen mit geringem Volumen zu messen. Es dauert nur etwa 1 sec, den Apparat von einem Küvettentyp auf den anderen umzustellen.

Dazu benützen wir einen exzentrischen Blendenhalter, der in der Eintrittsöffnung für den Lichtstrahl in das Küvettenhaus befestigt wird. Mit ihm kann man aus dem Lichtbündel an jeder beliebigen Stelle seines Querschnittes ein paralleles Strahlenbündel herausschneiden, das selbst für die kleinste verwendete Küvette paßt, wie z. B. auch für die Zeiss-Mikroküvette, die bei 1 ml Lösung eine Schichtdicke von 50 mm hat.

Die Arbeiten wurden durch Unterstützungen durch die schwedischen staatlichen medizinischen und naturwissenschaftlichen Forschungsräte ermöglicht.

Literatur

[1] Bergamini, C., u. M. Maltagliati: Sperimentale **6**, 65 (1956). — [2] Bergmann, J. G., u. J. Sanik jr.: Analyt. Chemistry **29**, 241 (1957); vgl. diese Z. **158**, 393 (1957). — [3] Bethge, P. O.: Anal. chim. Acta (Amsterdam) **10**, 310 (1954); vgl. diese Z. **144**, 378 (1955). — [4] Ferrari, C.: Gazz. chim. ital. **81**, 795 (1951). — [5] Ferrari, C.: Mikrochim. Acta (Wien) **1956**, 551; vgl. diese Z. **154**, 203 (1957). — [6] Gustafsson, L.: Talanta **4**, 227 (1960). — [7] Gustafsson, L.: Talanta **4**, 236 (1960). — [8] Kirsten, W. J.: Analyt. Chemistry **25**, 74 (1953); vgl. diese Z. **142**, 68 (1954). — [9] Kirsten, W. J.: Mikrochem. verein. Mikrochim. Acta **35**, 174 (1950); vgl. diese Z. **132**, 300 (1951). — [10] Kirsten, W. J.: Mikrochem. verein. Mikrochim. Acta **40**, 170 (1952); vgl. diese Z. **140**, 300 (1953). — [11] Kirsten, W. J.: Mikrochim. Acta (Wien) **1956**, 836; vgl. diese Z. **153**, 293 (1956). — [12] Kirsten, W. J.: Proceedings of the International Symposium on Microchemistry 1958, Pergamon Press, London, S. 132. — [13] Kirsten, W. J., u. M. E. Carlsson: Microchem. J. **4**, 3 (1960); vgl. diese Z. **179**, 64 (1961). — [14] Kirsten, W. J., u. B. W. Grunbaum: Analyt. Chemistry **27**, 1806 (1955); vgl. diese Z. **153**, 286 (1956). — [15] Kirsten, W. J., u. F. Högberg: Acta Soc. Med. Uppsaliensis **64**, 298 (1959). — [16] Körbl, J.: Mikro-

chim. Acta (Wien) **1956**, 1705; vgl. diese Z. **157**, 34 (1957). — [17] Lowry, D. H., u. O. A. Bessey: J. biol. Chemistry **16**, 633 (1946). — [18] Pett, L. B.: Biochemic. J. **27**, 1672 (1933); vgl. diese Z. **104**, 446 (1936). — [19] Schöniger, W.: Mikrochim. Acta (Wien) **1955**, 123; **1956**, 869; vgl. diese Z. **150**, 306 (1956); **154**, 158 (1957). — [20] Unterzaucher, J.: Chem.-Ing.-Techn. **22**, 39 (1950); vgl. diese Z. **132**, 291 (1951). — [21] Unterzaucher, J.: Mikrochem. verein. Mikrochim. Acta **36/37**, 706 (1951); vgl. diese Z. **136**, 217 (1952). — [22] Unterzaucher, J.: Mikrochim. Acta (Wien) **1957**, 448; vgl. diese Z. **161**, 279 (1958). — [23] Večeřa, M., J. Bulušek u. A. Spěvák: Mikrochim. Acta (Wien) **1958**, 47; vgl. diese Z. **164**, 447 (1958). — [24] Večeřa, M., u. A. Spěvák: Collect. czechoslov. chem. Commun. **21**, 1278 (1956); vgl. diese Z. **156**, 147 (1957). — [25] Zimmermann, W.: Mikrochem. verein. Mikrochim. Acta **31**, 15 (1943); **33**, 122 (1947); **35**, 80 (1950); **40**, 162 (1953); vgl. diese Z. **132**, 300 (1951); **143**, 366 (1954). — [26] Zinneke, F.: diese Z. **132**, 175 (1951).

Wolfgang J. Kirsten,
Mikroanalyslaboratoriet, Uppsala Universitits Medicinsk-Kemiska Institution, Uppsala (Schweden)

Department of Chemistry, University of Birmingham

Sub-micro Methods for the Analysis of Organic Compounds

By
R. Belcher

With 2 Figures in the Text

(Received October 24, 1960)

Methods for the determination of elements and functional groups in organic compounds in which the sample required is of the order of 30—50 μg (0.03 to 0.05 mg), i.e. amounts only just visible to the naked eye, have been developed over several years at the University of Birmingham. This technique is called sub-micro analysis. In order to obtain a quick grasp of how small these amounts are, a single grain of table sugar has an average weight of 200 μg; the samples used in the present system of analysis are one-eighth to one-quarter of this amount.

The investigation is by no means complete: nevertheless it can be claimed that the more important problems have been solved and it would be possible with the methods which have been developed, to determine the structure of many new compounds which are only available in trace amounts.

More than 40 years ago Professor Fritz Pregl of the University of Graz, developed his system of organic micro-analysis, which enabled the sample size required to be reduced from 300—500 mg to about 3—5 mg. This work had a profound impact in many fields of chemistry, but probably the most important was the rapid strides that resulted in biochemistry; substances available only in milligram amounts could be analysed for elements and functional groups, and their structures were

established in a fraction of the time which would have been necessary if Pregl's technique had not been available.

Since that time a few isolated attempts have been made to reduce the sample size further, but until several years ago when investigators such as KIRK[14], KIRSTEN[15] and KUCK[20] were successful in making a significant reduction in the scale of working, the amounts involved were only slightly less than those used by PREGL; these later methods require sample weights appreciably greater than ours.

Some twelve years ago the problem of reducing the amounts of sample to a much lower scale was considered by the present author. At that time, owing to lack of facilities it was not possible to begin the investigation immediately, but this fact proved to be an advantage, for it gave time for a broad plan of approach to be laid down; and as events have proved, this general plan has been shown to be satisfactory in most of its details. The outline of the general plan is described later.

General Outline of Technique

Size of Sample. Clearly there is a minimum amount of sample which can be handled conveniently, and this represents the limit to which the scale can be reduced. Such amounts are of the order of 25—50 μg and, as already mentioned, are just visible to the naked eye. It might be possible to go below this range by the use of lenses and special manipulating equipment, but it is doubtful whether it would ever be necessary to work at this level. The technique would be tedious and exhausting. Accordingly, the 25—50 μg level was chosen as the scale of operation: this is about one-hundredth of the scale of Pregel's method and represents a reduction of sample weight proportional to that which PREGL made from the macro-scale.

Line of Approach. After the amounts to be used had been decided, two possible approaches had to be considered.

a) Stepwise reduction of the size of sample from the micro-scale, so that sources of error could be followed at each stage.

b) Direct reduction to the scale chosen, the sources of error being dealt with as they became apparent. Although the first approach is the more logical it was considered to be too time-consuming and the second was chosen.

The Balance. The balances which were available at that time were capable of weighing accurately the amounts involved, but their cost was prohibitive. It seemed worthwhile, therefore, to attempt to develop a cheap, suitable balance as the first step in the project. The design of such a balance would be simplified if it were used only for the weighing of the sample i.e. if all the various determinations could be completed by non-gravimetric processes. Hence it was decided to concentrate exclusively on titrimetric procedures.

The balance we eventually constructed[1] is based on well known principles, but it has the advantage of robustness and cheapness (£ 100). It is still in constant use although more refined commercial models are now available (Fig. 1). The latter are more convenient to handle, but the cost is much greater.

Burette. Some attention had to be given to the type of burette and several suitable designs were found in literature. However, before the author's investigations were started, a piston-burette was made available commercially (The Agla syringe-burette, Burroughs Wellcome Ltd.) which proved to be ideally suited to our purpose. A typical titration assembly is shown in Fig. 2.

Fig. 1. Commercial Sub-Micro Balance

Decomposition of the Sample. It has been conventional practice for many years to decompose organic compounds by burning in a stream of oxygen and, for the determination of acid-forming elements, to absorb acid gases in a suitable liquid absorbent. It was visualised that this method might provide difficulties on the proposed scale of operation. Absorption might be incomplete and there would be more opportunity for contamination to occur from outside sources. It seemed that decomposition in a sealed tube (*Carius* technique) might have advantages and on the scale used, the less attractive features of this process, e.g. explosions, would disappear.

Many of the methods so far developed are based on sealed tube decomposition. However, more recently some success has been achieved with the method whereby the sample is burnt in a closed vessel containing oxygen, and some of the earlier methods are being re-examined using this decomposition process.

General Technique. Emphasis was placed on developing a simple technique so that the methods could be readily applied in any laboratory. This has been achieved, except in the determinations of carbon, fluorine, and arsenic; in all other methods the only special equipment required is the balance and the burette.

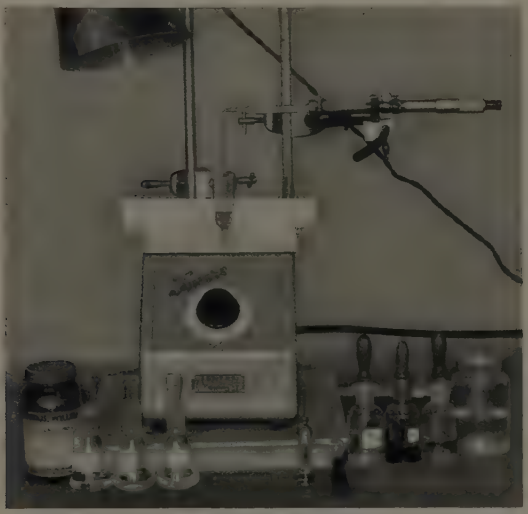


Fig. 2. Titration Assembly

Determinations

Nitrogen. Decomposition is effected at elevated temperatures in a sealed tube with sulphuric acid. The tube is opened and is then used as the titration vessel. This general technique is used whenever possible. The acid is neutralized and standard hypochlorite is added in excess to react with the ammonium sulphate formed. The excess of hypochlorite is then determined iodimetrically[9].

Sulphur. Sealed tube decomposition with fuming nitric acid in the presence of barium nitrate is used (*Carius* technique). The barium sulphate is filtered off, dissolved in an excess of ammonical EDTA and back-titrated with magnesium chloride using Erio T as indicator[3]. Decomposition in oxygen in a closed vessel is now being examined.

Chlorine, Bromine and Iodine. The samples are heated with sodium metal in a sealed tube. After destruction of excess of sodium the solution is treated according to the element required.

Iodine is oxidised to iodate with bromine water and bromide to bromate with hypochlorite[8] so that six-fold amplification is obtained in

the subsequent iodimetric titration. It is not possible to amplify chloride in this way, but an indirect amplification method has been developed. Metathesis with mercurous iodate releases an equivalent amount of iodate: this is titrated iodimetrically after filtering off the mercurous chloride and excess of mercurous iodate[11].

$$Hg_2(IO_3)_2 + 2\ Cl^- \rightarrow Hg_2Cl_2 + 2\ IO_3^-$$

This method is rather tedious, for the reaction time for complete metathesis is lengthy and there are several steps in the later operations. More recently decomposition in a small flask containing oxygen has been studied[13]. The determination is completed by titrating with mercuric nitrate in presence of diphenylcarbazone indicator in 80% alcoholic medium; this titration is based on Cheng's micromethod[12].

Fluorine. This determination is troublesome on any scale of operation, but as a result of investigations in another field[6] a new reaction of fluoride was discovered. Cerous alizarin complexan which is red in colour gives a blue colour with fluoride ions. It would seem that this is a 1:1:1 complex. It is the only direct colour reaction for fluoride so far discovered, interferences are few and anions likely to be present after decomposition of an organic compound, e.g. sulphate, are without effect. Decomposition is done in a sealed vessel containing oxygen and after reagent has been added, the colour is measured spectrophotometrically[7].

Carbon and Hydrogen. Many reactions were examined but eventually a manometric method had to be used. The apparatus required is fairly complex when compared with that required for other determinations, but once assembled, is easy to operate. The sample is burned in oxygen in a closed system and carbon dioxide and water are frozen out. So far only carbon can be determined satisfactorily; much of the water is lost by absorption on the internal surface of the apparatus. This problem is still being investigated. Carbon, however, can be determined in any type of organic compound; magnesium oxide has been found suitable for absorbing other products of decomposition, e.g. fluorine and other halogens and sulphur oxides. The accuracy is within ± 0.3 percent absolute and as little as 15 μg of sample has been analysed satisfactorily[2].

Phosphorus and Arsenic. Sealed tube decomposition with nitric acid failed for phosphorus because of losses of phosphoric acid by adsorption on the walls of the tube. Hence decomposition in oxygen in a sealed vessel was used. This technique was first described by Hempel in 1892[16] and was used by later workers up to 1920 when it seems to have been forgotten. It was revived by Mikl and Pech[16] in 1952 (semimicro) and Schöniger[16] in 1954 (micro). This proved quite successful on the submicro scale. Two methods of completion have been developed; in one, phosphate is precipitated as quinoline phosphomolybdate and is titrated

alkalimetrically: in the other, a spectrophotometric method is used based on the molybdenum blue colour. Arsenic can be determined similarly, but so far only the spectrophotometric method is available. Work is proceeding on a classical finish[17].

Functional Groups. Alkoxy-[4], N-methyl-[5] and carboxy-[18] determinations have been developed. Many determinations by titration in non-aqueous solution are also possible[10]. Methods for the determination of other functional groups are being studied.

Molecular Weight. The RAST method using camphor as solvent has been modified for work on the submicro scale[19]. A simple procedure has been worked out to overcome the problem of transferring the small amount of sample quantitatively to the melting-point tube. Preliminary experiments indicate that the method may be used for liquids[13].

Conclusion

The accuracy of these methods is similar to that obtained on the micro-scale and the technique can readily be acquired. The methods are not intended to replace micro-methods, but are for use when only very limited amounts of sample are available. It is too early to predict how useful the new technique will become, but it is undoubtedly in biochemistry and associated fields that its main application will be found; and it may be that its effect will be as pronounced as that of Pregl's technique some 40 years ago.

Summary

A new technique is described which enables organic compounds to be analysed for elements and functional groups using sample weights of 30—50 micrograms (0.03 to 0.05 mg). These amounts are only just visible to the naked eye. The accuracy is similar to that of the micro-scale, and the technique is fairly simple.

It is expected that these methods will be of value in biochemistry and associated fields where amounts of sample are often limited. The new technique is not intended to replace micro-methods. Investigations are still proceeding to develop further methods for the determination of functional groups and to refine earlier procedures.

Acknowledgement. The author would like to record that the development of this new technique has been an international project, and he had been fortunate in having had many excellent co-workers from various parts of the world taking part in it. Besides his British colleagues, Drs. M. K. BHATTY and R. A. SHAH are from Pakistan, Dr. R. L. BHASIN from India and Mr. S. E. PHANG from Singapore, Dr. L. B. SERRANO from Spain, Dr. J. G. BERGER from Denmark, Mr. P. GOUVERNEUR from Holland, and Dr. M. SOBOTKA from Austria. He must also acknowledge generous financial assistance initially from the Department of Scientific and Industrial Research and later from the U.S. Army Research Fund.

References

[1] Asbury, H., R. Belcher and T. S. West: Mikrochimica Acta **1956**, 598; cf. Z. analyt. Chem. **154**, 48 (1957). — [2] Ayers, C., R. Belcher and T. S. West: J. chem. Soc. (London) **1959**, 2582; cf. Z. analyt. Chem. **174**, 50 (1960). — [3] Belcher, R., R. L. Bhasin, R. A. Shah and T. S. West: J. chem. Soc. (London) **1958**, 4054; cf. Z. analyt. Chem. **168**, 214 (1959). — [4] Belcher, R., M. K. Bhatty and T. S. West: J. chem. Soc. (London) **1957**, 4480; cf. Z. analyt. Chem. **162**, 439 (1958). — [5] Belcher, R., M. K. Bhatty and T. S. West: J. chem. Soc. (London) **1958**, 2393; cf. Z. analyt. Chem. **165**, 464 (1959). — [6] Belcher, R., M. A. Leonard and T. S. West: J. chem. Soc. (London) **1958**, 2390; cf. Z. analyt. Chem. **165**, 446 (1959). — [7] Belcher, R., M. A. Leonard and T. S. West: J. chem. Soc. (London) **1959**, 3577. — [8] Belcher, R., R. A. Shah and T. S. West: J. chem. Soc. (London) **1958**, 2998; cf. Z. analyt. Chem. **167**, 289 (1959). — [9] Belcher, R., T. S. West and M. Williams: J. chem. Soc. (London) **1957**, 4323; cf. Z. analyt. Chem. **162**, 376 (1958). — [10] Berger, J. G.: M. Sc. Thesis, Birmingham Univ. 1958. — [11] Bhasin, R. L.: Ph. D. Thesis, Birmingham Univ. 1959. — [12] Cheng, F. W.: Microchem. J. **3**, 537 (1959); cf. Z. analyt. Chem. **177**, 366 (1960). — [13] Gouverneur, P.: unpublished studies. — [14] Kirk, P. L.: Quantitative Ultramicroanalysis, New York, Wiley, 1950. — [15] Kirsten, W.: Mikrochim. Acta (Wien) **1956**, 836; cf. Z. analyt. Chem. **153**, 293 (1956). — [16] Macdonald, A. M. G.: Ind. Chemist. **35**, 33 (1959). — [17] Phang, S. E.: M. Sc. Thesis, Birmingham Univ. 1959. — [18] Serrano, L. B.: M. Sc. Thesis, Birmingham Univ., 1958. — [19] Sobotka, M.: unpublished studies. — [20] Wilson, C. L.: Mikrochim. Acta (Wien) **1956**, 91; cf. Z. analyt. Chem. **155**, 39 (1957).

Professor R. Belcher, D. Sc.,
Dept. of Chemistry, University of Birmingham, Birmingham 15 (Great Britain)

Mikroanalytische Abteilung, Pharmazeutisches Departement der Sandoz A.G., Basel

Die Kolbenmethode in der organischen Mikroelementaranalyse

Von

W. Schöniger

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 15. Oktober 1960)

Zur quantitativen Bestimmung von den in organischen Verbindungen enthaltenen Elementen muß bekanntlich die organische Substanz zerstört und in leicht erfaßbare anorganische Verbindungen übergeführt werden. Diese Mineralisierung kann auf verschiedene Weise erfolgen. Werden oxydative Methoden verwendet, so kann dies mittels Verbrennung im Sauerstoffstrom, oder durch Aufschluß mit Sauerstoffdonatoren, z. B. mit Na_2O_2 oder Salpetersäure, geschehen. Bei vielen dieser Verfahren müssen aber mehr oder minder komplizierte Apparate verwendet werden, die leider in den letzten Jahrzehnten eher komplizierter als einfacher

wurden. Im folgenden soll nun über eine sehr einfache Verbrennungstechnik berichtet werden, die bereits vor mehr als einem halben Jahrhundert entwickelt wurde, in der Zwischenzeit aber völlig in Vergessenheit geraten ist.

Angeregt durch Versuche von BERTHELOT, der den Schwefelgehalt organischer Substanzen bestimmte, indem er diese in seiner calorimetrischen Bombe verbrannte, entwickelte HEMPEL[33] 1892 eine einfache Methode zur Schwefelbestimmung in Kohlen. Dabei wurde die zu analysierende Substanz zusammen mit einem feinen Platindraht zu einer Pastille gepreßt und diese dann in ein Platinkörbchen gegeben. Der Platindraht wurde um zwei Zuleitungsdrähte gewickelt, die in einem Gummistopfen befestigt waren und die ganze Anordnung in eine mit Sauerstoff gefüllte 10 l-Flasche gegeben (Abb. 1). Die Probe wurde elektrisch gezündet und der Schwefelgehalt nach erfolgter Absorption gravimetrisch bestimmt. Fast zur gleichen Zeit veröffentlichte MESLANS[56] ein Verfahren zur Fluorbestimmung in brennbaren Gasen, das auf einem ähnlichen Prinzip beruhte. An Stelle einer 10 l-Flasche wurde ein 500 ml-Kolben verwendet, durch dessen Verschlußstopfen drei Bohrungen führten. Die eine diente zur Aufnahme eines Einleitungsrohres, an dessen vorderem Ende eine Platincapillare eingeschmolzen war. Durch die beiden anderen wurden Platindrähte geführt, die im Kolben mit einer Spirale aus feinem Platindraht verbunden waren. Diese Spirale reichte zum Teil über die Capillare und wurde elektrisch erhitzt. Das zu analysierende Gas wurde aus einer Gasbürette eingeleitet, die Verbrennung erfolgte wieder im Sauerstoff. Die Endbestimmung wurde entweder maßanalytisch, durch Rücktitration von im Überschuß vorgelegter Lauge, oder gravimetrisch vorgenommen.

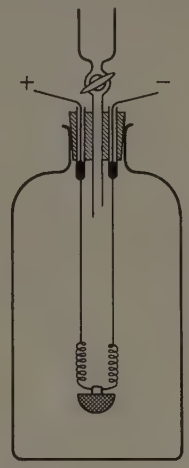


Abb. 1. Flasche zur Verbrennung in Sauerstoff nach HEMPEL

In der Folgezeit wurde einige Male der Versuch unternommen, dieses Hempelsche Verfahren der Verbrennung organischer Körper im geschlossenen System bekannt zu machen und in die organische Elementaranalyse einzuführen. So veröffentlichten GRAEFE[28] sowie MARCUSSON u. DÖSCHER[51] noch vor dem ersten Weltkrieg zwei Arbeiten, die wieder die Schwefelbestimmung organischer Substanzen durch Verbrennung in der Flasche zum Inhalt hatten. In beiden Arbeiten wurde die Substanzhalterung vereinfacht und auch auf die Möglichkeit der Chlorbestimmung nach dieser Methode hingewiesen. Zu Beginn der 20iger Jahre griff

Votoček[80] das Verfahren noch einmal auf. Er machte einige Versuche zur Chlorbestimmung und verwendete an Stelle der bisher empfohlenen Flasche einen 5 l-Scheidetrichter als Verbrennungskammer, da sich aus diesem die Absorptionslösung nach erfolgter Verbrennung leichter ausspülen ließ. Die Endbestimmung des Chlorions führte er mit Quecksilbernitrat und Natriumnitroprussid als Indicator durch. In den folgenden Jahrzehnten geriet dieses Verfahren wahrscheinlich unter dem Eindruck der Preglschen Mikromethoden vollkommen in Vergessenheit.

Am 1. Internationalen Mikrochemischen Kongreß in Graz (1950) berichtete Roth[67] über eine Methode zur Spurenbestimmung von Schwefel, die ebenfalls als eine Verbrennung in der Flasche zu betrachten ist. Bei dieser Methode wird die Probe in einem Porzellantiegel eingewogen und zusammen mit beigegebener Eschka-Mischung mittels eines Papierstreifens in einer mit Sauerstoff gefüllten 2 l-Flasche entzündet. Nach erfolgter Verbrennung wird die Aufarbeitung zur endgültigen colorimetrischen Schwefelbestimmung außerhalb der Flasche durchgeführt.

Kurze Zeit später veröffentlichten Mikl u. Pech[57,58] zwei Arbeiten, in denen sie eine einfache Methode zur Chlor- und Schwefelbestimmung organischer Körper beschrieben, die ebenfalls auf der Verbrennung der zu analysierenden Substanz im geschlossenen System beruht.

> Ungefähr 0,1 g Substanz wurden in ein Filterpapier eingewickelt, dieses Paket etwas befeuchtet und in einer Öse eines Glasstabes befestigt. Dieser Stab steckt in einem Gummistopfen, der in den Hals einer 1 Liter-Flasche paßt. Nach Einbringen der Absorptionslösung wird die Flasche mit Sauerstoff gefüllt und die Substanz darin verbrannt.

Obzwar sich nach einer Mitteilung von Pech[61] dieses Verfahren wohl für die Betriebskontrolle, nicht aber für wissenschaftliche Arbeiten eignen sollte, wurde ausgehend von den zuletzt genannten Arbeiten eine Mikromethode für die Bestimmung des Halogen- und Schwefelgehaltes ausgearbeitet[69,70]. Schon bei diesen ersten Untersuchungen zeigte es sich, daß dieses Verbrennungsprinzip auch auf die Bestimmung anderer Elemente anwendbar ist. In der Zwischenzeit wurde diese Vermutung durch die große Zahl der seither erschienenen Arbeiten voll bestätigt.

Apparatives

An Stelle der von Hempel[33] für die Mikroanalyse vorgeschlagenen 10 l-Flasche, werden heute für Mikrobestimmungen fast ausschließlich Erlenmeyer-Kolben von 250—300 ml Inhalt mit Schliffstopfen verwendet (Abb. 2). Werden größere Einwaagen (etwa 50 mg) verbrannt, so empfiehlt sich die Verwendung eines 500 ml-Kolbens. Zur Aufhebung des nach erfolgter Absorption der Verbrennungsprodukte entstehenden Vakuums haben mehrere Autoren[75,78] seitliche Ansatzrohre, die mit einem Hahn

versehen sind, vorgeschlagen. In einer Arbeit wird empfohlen, über ein Ansatzrohr einen Luftballon zu ziehen[43], der während der Verbrennung für Druckausgleich sorgt. Von LEHNER[44] wird eine sehr gute Kolbenvariante für Spurenbestimmungen vorgeschlagen (Abb. 3). HASLAM u. Mitarb.[31,32], die zunächst die Verbrennung in einem 500 ml-Scheidetrichter ausgeführt haben, empfehlen in einer weiteren Arbeit einen Rundkolben mit angesetztem Titrationsgefäß, der mit der eben erwähnten Anordnung von LEHNER identisch ist.

Bei einigen Bestimmungsmethoden ist es sicher von Vorteil, an Stelle der Platinhalterung eine solche aus Quarz, ja vielleicht sogar auch einen

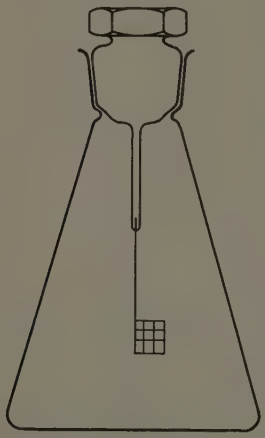


Abb. 2. 300 ml-Kolben für die Mikroanalyse

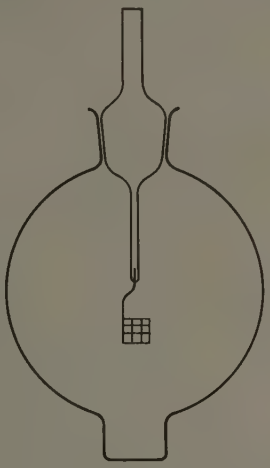


Abb. 3. Kolben für Spurenanalyse nach LEHNER

Quarzkolben zu verwenden[55]. Von einigen Autoren[17,30,31,33,52] wird empfohlen, die Verbrennung aus Sicherheitsgründen im bereits verschlossenen Kolben mit elektrischer Fernzündung einzuleiten, wie es selbstverständlich bei den Versuchen zur C-Bestimmung im Kolben erforderlich ist. ARCHER[3] schlägt vor, das auf einem perforierten Platinblech liegende Substanzpaket mittels eines heißen Glasstabes zu zünden.

Für die Verbrennung von Substanzen, die am Platinnetz haftende Oxyde geben (metallorganische Verbindungen) oder die mit Zuschlägen verbrannt werden müssen, hat sich folgende Modifikation bewährt[72]:

In den Kolbenschliff wird eine Schliffreduktion eingesetzt und der Glasstab des Schliffstopfens, an welchem sich das Platinnetz befindet, entsprechend verlängert. Nach erfolgter Verbrennung und Absorption wird die Schliffreduktion entfernt. Nun kann das Platinnetz in die Absorptionslösung eingetaucht und der daran haftende Beschlag bequem abgelöst werden.

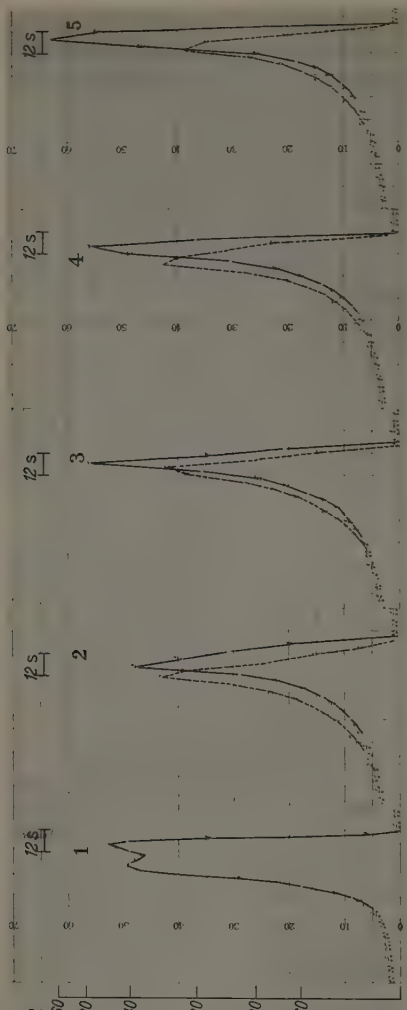


Abb. 4. Temperaturmessungen während der Verbrennung. ——— Neben dem Substanzpaket; ------- im Substanzpaket. *1, 2* Filterpapier + Analysensubstanz, *3, 4* mit Dekalinzusatz, *5* Methylcellulose + Analysensubstanz

Schließlich sei noch erwähnt, daß bei der Fa. Du Pont in Wilmington die Verbrennung in außen mit Eiswasser gekühlten Polyäthylenkolben erfolgreich ausgeführt wurde und in diesen Laboratorien derzeit unter Verwendung dieses Kolbens eine Methode zur Bestimmung von Kalium- und Natriumspuren ausgearbeitet wird[63].

Flüssigkeiten können nach KIRSTEN[38] folgendermaßen eingewogen werden:

Ungefähr 15 mm lange Stückchen eines Polyäthylenschlauches von etwa 1 mm innerem Durchmesser werden an einer Seite verschmolzen. Man stopft etwas Watte in das Röhrchen und bringt die zu analysierende Flüssigkeit mittels einer Injektionsspritze ein. Nach erfolgter Wägung kann auch das zweite Ende verschmolzen werden. Diese „Capillare" wird dann wie üblich in ein Stück Filterpapier eingewickelt. Sehr gut eignen sich hierzu auch die käuflich erhältlichen Methylcellulosekapseln*. BENNEWITZ[10] trägt Flüssigkeiten mit einem KP $>$ 200° C direkt auf Filterpapier auf, tiefersiedende Flüssigkeiten werden in einem dünnwandigen Glaskügelchen eingewogen (siehe auch[69]). Dieses wird aber vor der Verbrennung nicht zerdrückt.

Weitere Vorschläge empfehlen die Selbstherstellung von „Phiolen" aus Celluloseklebeband mit Filterpapiereinlage[19], sowie die Verwendung

* Erhältlich durch A. H. Thomas Co., Philadelphia, Pa. (USA).

von Watteküglelchen als Flüssigkeitsträger[23]. Auch mit Kollodium überzogene Filterpapierkonusse[43], Konusse aus Celluloseacetatfolie[46] oder Cellophan[37] werden verwendet. Letztere erweisen sich für das vorherige Eindampfen von Lösungen, bzw. Extrakten als vorteilhaft.

Zum Verbrennungsvorgang selbst ist folgendes zu sagen: Es ist unwahrscheinlich, daß das Platinnetz als Verbrennungskatalysator dient. Als Beweis kann die erfolgreiche Verwendung von Halterungen aus Quarz[54], Glas[20] oder Wolframdraht[12] angesehen werden. Vielmehr dürfte die hohe Temperatur und der charakteristische Verbrennungsablauf die vollständige Zerstörung der organischen Substanz gewährleisten. Um ein genaues Bild über die Verbrennung zu bekommen, wurden registrierende Temperaturmessungen durchgeführt. Wie aus der Abb. 4 zu sehen ist, wurden Temperaturen bis zu 1300° C gemessen. Es konnte ferner gezeigt werden, daß sich zunächst um die Stelle, an welcher sich das Substanzpaket befindet, eine sehr heiße Zone bildet, durch welche die Substanzdämpfe strömen müssen. Nur so ist es zu verstehen, daß trotz der sehr kurzen Reaktionszeit ($\sim$ 20 sec) eine vollständige Verbrennung stattfindet. Die von verschiedenen Autoren[7,23,71,77] empfohlenen Zuschläge (z. B. Na_2O_2, $KClO_3$) dürften auch in erster Linie eine zusätzliche Temperatursteigerung hervorrufen.

Bestimmungsmethoden

1. Chlor und (oder) Brom

Fast alle bisher erschienenen Arbeiten empfehlen eine alkalische Absorptionslösung der etwas Perhydrol zugegeben ist, da bei der Verbrennung in elementarer Form freigewordenes Halogen vor der Endbestimmung reduziert werden muß. Für die Bestimmung des Chlorids bzw. Bromids kommen folgende Möglichkeiten in Frage:

Quecksilberhydroxycyanid-Methode. Die neutralisierte Absorptionslösung wird mit neutraler Quecksilberhydroxycyanidlösung versetzt und die dem Halid äquivalente freigesetzte Menge OH' acidimetrisch bestimmt[79].

Argentometrische Titration in neutraler 80%iger isopropanolischer Lösung mit Dichlorfluorescein[82] oder in wäßrigem Aceton mit Dithizon[3] als Indicator. Eine Arbeitsgruppe empfiehlt die Verwendung von Variaminblau B, das mit Ag-Ionen eine blaue Färbung gibt, als Indicator[21].

Mercurimetrische Titration unter Verwendung von n Quecksilbernitrat- oder Perchloratlösung[16,64,75]. Diphenylcarbazon wird als Indicator verwendet, ein p_H von 2,5—3,5 muß eingehalten werden. Zugabe von mit Wasser mischbaren Lösungsmitteln, wie Methanol, Äthanol oder Isopropanol verstärkt die Indicatorfärbung und unterdrückt die ohnehin schon schwache Dissoziation des Quecksilberhalids.

Colorimetrische Bestimmung nach Zugabe von Quecksilberchloranilatlösung in 50% Methylcellosolve zur Absorptionslösung. Die dem Halid äquivalente Menge Chloranilsäure wird bei 530 bzw. 305 nm quantitativ bestimmt[47].

Die *potentiometrische Titration* wird von Corner[19], Haslam u. Mitarb.[31], Bethge u. Troëng[12] sowie Lehner[44] empfohlen, letzterer hat ein Verfahren zur Spurenbestimmung von Chlor ausgearbeitet. Olson u. Krivis[59] schlagen eine coulometrische Endbestimmung vor.

Die *jodometrische Brombestimmung*, wie sie von Kolthoff[40] ausgearbeitet wurde, kann mit gutem Erfolg angewendet werden und bietet zudem den Vorteil, daß ausschließlich Brom erfaßt wird.

2. Jod

Mit einer Ausnahme wird die Leipertsche Methode[45], bei der das Jod nach erfolgter Oxydation zu Jodat bestimmt wird, empfohlen. Eine vergleichende Untersuchung von Konovalov[41] kann als Beweis für die gute Anwendbarkeit dieses Verfahrens angesehen werden. Erdey u. Mitarb.[21] schlagen die argentometrische Endbestimmung mit Variaminblau B als Indicator vor. Zu diesem Zweck muß jedoch sämtliches Jod in Jodid übergeführt werden.

3. Fluor

Bei der Verbrennung ist die Verwendung von Zuschlägen (Na_2O_2, $KClO_3$) empfehlenswert, da sonst die Gefahr besteht, daß nicht alle C-F-Bindungen zerstört werden[7,23,37,71,77]. Für die Endbestimmung des entstandenen Fluorids sind ebenfalls verschiedene Verfahren vorgeschlagen worden. Zunächst wurde die Methode von Brunisholz u. Michod[15] angewendet, und Wallenfels u. Draber[83] sowie Goldstein[27] bestätigen deren Brauchbarkeit. Steyermark u. Mitarb.[77] empfehlen die Thoriumnitrattitration mit Natriumalizarinsulfonat als Indicator und photometrische Endpunktsermittlung. Da gleichzeitig anwesendes Quecksilber, Phosphor oder Arsen stören, muß in solchen Fällen vor der Titration eine Perchlorsäuredestillation durchgeführt werden (siehe Ma u. Gwirtsman[50]). Colorimetrische Verfahren werden von Senkowski u. Mitarb.[71] sowie Rogers u. Yasuda[66] empfohlen. Erstere verwenden Zirkonylerochromcyanin R, letztere Eisen(III)-salicylat als Reagens. Belcher u. Mitarb.[7] entdeckten vor einiger Zeit eine neue positive Farbreaktion für Fluorid. Eine vergleichende Untersuchung verschiedener Fluorbestimmungsmethoden wurde von Soep[73] durchgeführt.

4. Schwefel

Die Verbrennungsprodukte werden entweder in mit Perhydrol versetztem Wasser oder verdünnter Lauge aufgefangen. Sind in den zu

analysierenden Verbindungen nur C, H, O und S enthalten, so kann letzteres direkt acidimetrisch bestimmt werden[48,70]. Das eleganteste Verfahren ist jedoch zweifelsohne die von Fritz u. Yamamura[81b] eingeführte und von Wagner[81a] als Mikromethode ausgearbeitete Titration mit Bariumperchlorat in 80%igem Isopropanol unter Verwendung von Thorin(2[2-Hydroxy-3,6-disulfo-1-naphthoylazo]-phenylarsonsäure) als Indicator (siehe auch Alicino[1]). Bei Verwendung eines speziellen Verbrennungskolbens können auf diese Weise auch noch Spuren von Schwefel bestimmt werden[44]. Andere Autoren haben eine gravimetrische Endbestimmung[48], die komplexometrische Bestimmung nach Schwarzenbach u. Mitarb.[2,6,62], Fällung und anschließende photometrische Bestimmung mit ÄDTA[14], die colorimetrische Bestimmung nach Umsetzung mit Bariumchloranilat[49], eine potentiometrische Titration mit Bariumchlorid[60] und eine amperometrische Bestimmung mit Bleinitrat[25] empfohlen. Soep u. Demoen[74] führten eine vergleichende Untersuchung von mehreren Endbestimmungen im Anschluß an die Kolbenverbrennung durch.

5. Schwefel und Halogen gleichzeitig

Ein Verfahren zur gleichzeitigen Schwefel- und Halogenbestimmung in einer Einwaage wurde von Boetius u. Mitarb.[13] entwickelt. Man titriert zunächst das entstandene Sulfat mit Bariumnitrat und Natriumalizarinsulfonat als Indicator und anschließend Chlorid bzw. Bromid nach Volhard. Neben Schwefel vorhandenes Jod kann nach Leipert bestimmt werden.

Die bereits erwähnte argentometrische Halidbestimmung von Erdey u. Mitarb. kann auch im Anschluß an eine Sulfatbestimmung nach Fritz u. Yamamura[81b] verwendet werden, wenn das Isopropanol vor der Halidtitration durch Kochen entfernt wurde[21]. Wird zur Chlor- bzw. Bromtitration isopropanolische Silberperchloratlösung verwendet, so kann man nach Giesselmann u. Hagedorn[24] auf elegante Weise sofort nach der Schwefelbestimmung die Halogentitration durchführen.

6. Phosphor

Von verschiedenen Autoren wird die bekannte colorimetrische Phosphatbestimmung mit der Molybdänblaureaktion empfohlen[5,18,22,53]. Wenn die Phosphormolybdänsäure vor der Reduktion mit einem Amylalkohol-Äthergemisch extrahiert wird, so können nach Gubser[29] noch Spuren Phosphor erfaßt werden (0,0004% in 50 mg Einwaage). Belcher u. MacDonald[8] absorbieren die Verbrennungsprodukte zur Phosphorbestimmung in Natriumhypobromitlösung, fällen als Chinolinphosphomolybdat und führen die Endbestimmung maßanalytisch durch Titration des aufgelösten Niederschlages aus. Fleischer u. Mitarb.[22]

empfehlen bei Halbmikroanalysen Fällung mit Magnesiamischung und komplexometrische Endbestimmung. Bennewitz u. Tänzer[11] geben ebenfalls eine komplexometrische Bestimmung an. Eine sehr einfache und rasche Arbeitsvorschrift, bei der in der Siedehitze mit 3wertigem Cer unter Verwendung von Eriochromschwarz T titriert wird, schlagen Püschel u. Wittmann[65] vor. Eine vergleichende Untersuchung verschiedener Methoden wurde von Kirsten u. Carlsson[39] veröffentlicht.

7. Andere Elemente

Götte u. Mitarb.[26] bestimmen ^{14}C nach Fällung als Bariumcarbonat. Kelly u. Mitarb.[37] verbrennen ^{14}C- und ^{3}H-haltige Verbindungen im Kolben und führen die Endbestimmung mit einem Flüssigkeitscintillationszähler durch. Habersbergerová u. Cífka[30] führen[35] S-Bestimmungen ebenfalls im Kolben durch.

Southworth u. Mitarb.[76] veröffentlichen eine Methode zur Quecksilberbestimmung, Belcher u. Mitarb.[9] geben eine komplexometrische Endbestimmung für die Analyse verschiedener metallorganischer Verbindungen (Zn, Mg, Cd) an. Auch Bor kann mit der Kolbenverbrennung quantitativ erfaßt werden[19,68,84], ebenso Arsen nach Merz[54] und Selen nach Gubser[29].

Von Interesse sind die Versuche zur C-Bestimmung, die von Juvet u. Chiu[36] und von Cheng u. Smullin[17] durchgeführt wurden. Nach diesen Autoren soll die Kohlenstoffbestimmung auch dann durchführbar sein, wenn in der Substanz zusätzlich N, Hal und S enthalten sind.

8. Spezielle Methoden

Nach Barney II u. Mitarb.[4] kann der Phosphorgehalt in Schmierölen mit der Kolbenmethode genau so sicher bestimmt werden, wie mit der offiziellen ASTM-Methode. Kremsbrucker[42] bestimmt den Phosphorgehalt in Arzneimitteln und Johnson u. Vickers[35] untersuchten die Brauchbarkeit der Kolbenverbrennung für die Jodbestimmung als Pharmacopöemethode und Ora[59a] den Totalschwefelgehalt in Sulfitablaugen.

Langecker[43] bestimmt den Jodgehalt in kontrastmittelhaltigen Sekreten und Exkreten. Lisk[46] beschreibt die Anwendung der Kolbenmethode für die Bestimmung von Rückständen von chlorhaltigen Insecticiden auf Futtermitteln. Bethge u. Troëng[12] geben eine Vorschrift zur Chlorbestimmung in Holz und Papier an, Haslam u. Mitarb.[32] verwenden die Methode zur Analyse von Polymeren. Iismaa[34] bestimmt den Schwefelgehalt in Pflanzen.

Zusammenfassung

Mit dieser kurzen Übersicht sollte der Beweis erbracht werden, daß die Kolbenmethode, d. h. die Verbrennung organischer Substanzen in

einem geschlossenen, mit Sauerstoff gefüllten Gefäß, einen sehr großen Anwendungsbereich in der Elementaranalyse hat. Als besondere Vorteile dieses Aufschlußverfahrens sind zu erwähnen:

Das verwendete Gerät ist äußerst einfach, der Analytiker hat völlige Freiheit in der Wahl der Endbestimmung, die Methode eignet sich sehr gut für Serienanalysen in Routinebetrieb, und schließlich können mit diesem Verfahren auf einfache Weise auch qualitative Analysen und Spurenbestimmungen durchgeführt werden.

Es ist mit Sicherheit anzunehmen, daß für diese Verbrennungsmethode weitere Anwendungsmöglichkeiten gefunden werden.

Literatur

[1] Alicino, J. F.: Microchem. J. **2**, 83 (1958); vgl. diese Z. **166**, 48 (1959). — [2] Anderegg, G., H. Flaschka, R. Sallmann u. G. Schwarzenbach: Helv. chim. Acta **37**, 113 (1954); vgl. diese Z. **143**, 297 (1954). — [3] Archer, E. E.: Analyst **83**, 571 (1958); vgl. diese Z. **169**, 153 (1959). — [4] Barney II, J. E., J. G. Bergmann u. W. G. Tuskan: Analyt. Chemistry **31**, 1394 (1959); vgl. diese Z. **174**, 298 (1960). — [5] Bartels, U., u. H. Hoyme: Chem. Techn. **11**, 156 (1959); vgl. diese Z. **172**, 75 (1960). — [6] Bartels, U., u. H. Hoyme: Chem. Techn. **11**, 600 (1959); vgl. diese Z. **176**, 47 (1960). — [7] Belcher, R., M. A. Leonard u. T. S. West: J. chem. Soc. (London) **1959**, 3577. — [8] Belcher, R., u. A. M. G. MacDonald: Talanta (London) **1**, 185 (1958); vgl. diese Z. **168**, 213 (1959). — [9] Belcher, R., A. M. G. MacDonald u. T. S. West: Talanta (London) **1**, 408 (1958); vgl. diese Z. **170**, 448 (1959). — [10] Bennewitz,R.: Mikrochim. Acta (Wien) **1960**, 54; vgl. diese Z. **178**, 53 (1960). — [11] Bennewitz, R., u. I. Tänzer: Mikrochim. Acta (Wien) **1959**, 835; vgl. diese Z. **176**, 46 (1960). — [12] Bethge, P. O., u. T. Troëng: Svensk. Papperstidn. **62**, 598 (1959). — [13] Boëtius, M., G. Gutbier u. H. Reith: Mikrochim. Acta (Wien) **1958**, 321; vgl. diese Z. **166**, 286 (1959). — [14] Boos, R. N.: Analyst **84**, 633 (1959); vgl. diese Z. **176**, 47 (1960). — [15] Brunisholz, G., u. J. Michod: Helv. chim. Acta **37**, 598 (1954); vgl. diese Z. **144**, 386 (1955). — [16] Cheng, F. W.: Microchem. J. **3**, 537 (1959); vgl. diese Z. **177**, 366 (1960). —[17] Cheng, F. W., u. C. F. Smullin: Microchem. J. **4**, 213 (1960). — [18] Cohen, L. E., u. F. W. Czech: Chemist-Analyst **47**, 86 (1958); vgl. diese Z. **170**, 449 (1959). — [19] Corner, M.: Analyst **84**, 41 (1959); vgl. diese Z. **171** 276 (1959/60). — [20] Eder K.: Mikrochim. Acta (Wien) **1960**, 471. — [21] Erdey, L., L. Mazor u. T. Meisel: Mikrochim. Acta (Wien) **1958**, 140; vgl. diese Z. **164**, 447 (1958). — [22] Fleischer, K. D., B. C. Southworth, J. H. Hodecker u. M. M. Tuckerman: Analyt. Chemistry **30**, 152 (1958); vgl. diese Z. **163**, 386 (1958). — [23] Francis, H. J., jr.: Pennsalt Chemicals Corp., Philadelphia, Pa. (USA). Private Mitteilung. — [24] Giesselmann, G., u. I. Hagedorn: Mikrochim. Acta (Wien) **1960**, 390. — [25] Gildenberg, L.: Microchem. J. **3**, 167 (1959); vgl. diese Z. **173**, 314 (1960). — [26] Götte, H., R. Kretz u. H. Baddenhausen: Angew. Chem. **69**, 561 (1957). — [27] Goldstein, M.: Univ. Jerusalem (Israel). Private Mitteilung. — [28] Graefe, E.: Z. angew. Chem. **17**, 616 (1904). — [29] Gubser, H.: Chimia (Aarau) **13**, 245 (1959); vgl. diese Z. **175**, 59 (1960). — [30] Habersbergerová-Jeníčková, A., u. J. Cífka: Collect. czechoslov. chem. Commun. **24**, 3777 (1959). — [31] Haslam, J., J. B. Hamilton u. D. C. M. Squirrell: Analyst **85**, 556 (1960). — [32] Haslam, J., J. B. Hamilton u. D. C. M. Squirrell: J. appl. Chem. **10**, 97 (1960). — [33] Hempel, W.: Z. angew. Chem. **5**, 393 (1892). — [34] Iismaa, O.: J. Austral. Inst. agric. Sci. **25**, 136 (1959). —[35] Johnson, C. A., u.

C. Vickers: J. Pharmaci Pharmacol., Suppl. **11**, 218 T (1959). — [36] Juvet, R. S., u. J. Chiu: Analyt. Chemistry **32**, 130 (1960); vgl. diese Z. **178**, 369 (1960). — [37] Kelly, R. G., E. A. Peets, S. Gordon u. D. A. Buyske: Abstr. ACS-Meeting Sept. 1960, 57 C. — [38] Kirsten, W. J.: Proceedings of the International Symposium on Microchemistry, Pergamon Press London (1959), S. 132. — [39] Kirsten, W. J., u. M. E. Carlsson: Microchem. J. **4**, 3 (1960). — [40] Kolthoff, I. M.: Ind. Engng. Chem., anal. Edit. **9**, 75 (1937). — [41] Konovalov, A.: Ind. chim. belge **23**, 19 (1958). — [42] Kremsbrucker, H.: Sc. pharmaceutica **27**, 294 (1959). — [43] Langecker, H.: Klin. Wschr. **37**, 471 (1959). — [44] Lehner, H.: Chimia (Aarau) **13**, 248 (1959); vgl. diese Z. **175**, 205 (1960). — [45] Leipert, T.: Biochem. Z. **261**, 436 (1933); vgl. diese Z. **97**, 368 (1934). — [46] Lisk, J. D.: J. agric. Food Chem. **8**, 119 (1960). — [47] Lysyj, I.: Microchem. J. **3**, 529 (1959); vgl. diese Z. **178**, 372 (1960). — [48] Lysyj, I., u. J. E. Zarembo: Analyt. Chemistry **30**, 428 (1958); vgl. diese Z. **166**, 50 (1959). — [49] Lysyj, I., u. J. E. Zarembo: Microchem. J. **3**, 173 (1959); vgl. diese Z. **173**, 315 (1960). — [50] Ma, T. S., u. J. Gwirtsman: Analyt. Chemistry **29**, 140 (1957); vgl. diese Z. **158**, 220 (1957). — [51] Marcusson, J., u. H. Döscher: Chemiker-Ztg. **34**, 417 (1910); vgl. diese Z. **50**, 388 (1911). — [52] Martin, A. J., u. H. Deveraux: Analyt. Chemistry **31**, 1932 (1959); vgl. diese Z. **176**, 43 (1960). — [53] Merz, W.: Mikrochim. Acta (Wien) **1959**, 456; vgl. diese Z. **172**, 302 (1960). — [54] Merz, W.: Mikrochim. Acta (Wien) **1959**, 640; vgl. diese Z. **176**, 378 (1960). — [55] Merz, W.: Private Mitteilung. — [56] Meslans, M.: Bull. Soc. chim. France (3) **9**, 109 (1893). — [57] Mikl, O., u. J. Pech: Chem. Listy **46**, 382 (1952); vgl. diese Z. **139**, 136 (1953). — [58] Mikl, O., u. J. Pech: Chem. Listy **47**, 904 (1953); vgl. diese Z. **142**, 76 (1954). — [59] Olson, E. C., u. A. F. Krivis: Microchem. J. **4**, 181 (1960). — [59a] Ora, A.: Paperi ja Puu **42**, 299 (1960). — [60] Ottosson, R., u. O. Snellman: Acta chem. scand. **11**, 185 (1957); vgl. diese Z. **158**, 439 (1957). — [61] Pech, J.: Private Mitteilung. — [62] Philipp, B., U. Bartels u. H. Hoyme: Mitteilungsbl. chem. Ges. DDR, Sonderheft 1960. Analytische Chemie S. 359. — [63] Pickhardt, W. D.: E. I. Du Pont de Nemours & Co., Exptl. Station, Wilmington, Del. (USA). Private Mitteilung. — [64] Praeger, K., u. H. Fürst: Chem. Techn. **10**, 537 (1958). — [65] Püschel, R., u. H. Wittmann: Mikrochim. Acta (Wien) **1960**, 670. — [66] Rogers, R. N., u. S. K. Yasuda: Analyt. Chemistry **31**, 616 (1959); vgl. diese Z. **173**, 315 (1960). — [67] Roth, H.: Mikrochem. verein. Mikrochim. Acta (Wien) **36/37**, 379 (1951); vgl. diese Z. **135**, 239 (1952). — [68] Schöniger, W.: Eigene unveröffentlichte Versuche. — [69] Schöniger, W.: Mikrochim. Acta (Wien) **1955**, 123; vgl. diese Z. **150**, 306 (1956). — [70] Schöniger, W.: Mikrochim. Acta (Wien) **1956**, 869; vgl. diese Z. **154**, 158 (1957). — [71] Senkowski, B. Z., E. G. Wollish u. E. G. E. Shafer: Analyt. Chemistry **31**, 1574 (1959); vgl. diese Z. **174**, 447 (1960). — [72] Gedansky, S. J., J. E. Bowen u. O. I. Milner: Analyt. Chemistry **32**, 1447 (1960). — [73] Soep, H.: Meded. vlaamse chem. Veren. **21**, 31 (1959). — [74] Soep, H., u. P. Demoen: Microchem. J. **4**, 77 (1960). — [75] Sokolova, N. V., V. A. Orestova u. N. A. Nikolayeva: Ž. anal. Chim. **14**, 472 (1959); vgl. diese Z. **175**, 383 (1960). — [76] Southworth, B. C., J. H. Hodecker u. K. D. Fleischer: Analyt. Chemistry **30**, 1152 (1958); vgl. diese Z. **166**, 283 (1959). — [77] Steyermark, A., R. R. Kaup, D. A. Petras u. E. A. Bass: Microchem. J. **3**, 523 (1959); vgl. diese Z. **178**, 371 (1960). — [78] Ueno, K.: J. Japan Chemistry **12**, 942 (1958). — [79] Vieböck, F.: Ber. dtsch. chem. Ges. **65**, 496 (1932); vgl. diese Z. **99**, 156 (1934). — [80] Votoček, E.: Chem. Listy **16**, 248 (1922). — [81] a) Wagner, H.: Mikrochim. Acta (Wien) **1957**, 19; vgl. diese Z. **158**, 439 (1957). — b) Fritz, J. S., u. S. S. Yamamura: Analyt. Chemistry **27**, 1461 (1955); vgl. diese Z. **154**, 283 (1957). — [82] Wagner, H., u. F. Bühler: Mikrochem. verein. Mikrochim. Acta (Wien) **36/37**, 641 (1951); vgl. diese Z. **135**, 451 (1952). — [83] Wallenfels, K., u.

W. Draber: Chem. Ber. 90, 2819 (1957). — [84] Yasuda, S. K., u. R. N. Rogers: Microchem. J. 4, 155 (1960).

Dr. W. Schöniger, Mikroanalytische Abteilung, Pharmazeut. Departement der Sandoz A.G., Basel 13 (Schweiz)

Institut für Analytische Chemie der Technischen Hochschule Wien

Ein Beitrag zur Automatisierung in der Mikroelementaranalyse

Von
H. Malissa

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 18. November 1960)

1. Einleitung und kurzer Überblick

Wenn man sich die Vorträge und Diskussionen über die Mikroelementaranalyse, die anläßlich des Internationalen Mikrochemischen Kongresses 1958 in Birmingham[13a] gehalten wurden und auch jene, die vor einiger Zeit anläßlich der Emich-Feier in Graz zu Gehör gebracht wurden, in Erinnerung zurückruft, so gewinnt man den bestimmten Eindruck, daß auch die Mikroelementaranalytiker den Wunsch nach Automatisierung in immer stärkerem Maße äußern. Gemeint ist natürlich die echte Automatisierung, also nicht nur die Steuerung des Verbrennungsvorganges, sondern auch die Erfassung *und* Auswertung der Meßgrößen.

Wenn man einem Automatisierungsfachmann das Problem der automatischen Mikro-Kohlenstoff- und Wasserstoffanalyse vorlegen würde und dieser nicht nach der Zweckmäßigkeit eines solchen Beginnens — also nicht nach dem wofür — fragt, wird er unter Ausschaltung vieler anderer Fragemöglichkeiten vielleicht folgendermaßen fragen:

1. Was soll analysiert werden; d. h. welche Produkte?
2. Welche Endprodukte sind für das zu analysierende Produkt analytisch kennzeichnend und erfaßbar?
3. Welche Methoden stehen zur Verfügung?

Die Antwort zu Punkt 1 lautet: möglichst die ganze Palette der organischen Verbindungen.

Zu Punkt 2 ist schon mehr zu sagen. Bis vor wenigen Jahren waren die chemischen Endprodukte der Mikro-C-H-Bestimmung, Kohlendioxid und Wasser. Jetzt können unter anderem noch hinzukommen: Acetylen, z. B. bei der gaschromatographischen Wasserbestimmung, oder

Jod bei der Reduktion im Kohleofen, wie dies bereits Unterzaucher getan hat, oder gar nur Impulse eines Geigerzählers, wenn wir die jüngsten Ansätze der radiometrischen oder röntgenfluorescenzanalytischen Verfahren betrachten.

Damit ist bereits Punkt 3 berührt, und wir müssen eine Inventarisierung der uns zur Verfügung stehenden Methoden anstellen.

In Tab. 1 ist eine kleine Inventarliste zusammengestellt.

Tabelle 1. *Grundtypen der C-H-Bestimmung*

Nr.	Methode	Verbrennung	Gasstrom ml/min	Endbestimmung
1	Pregl-Typ	gefülltes Rohr, 600—800° C	5—10	gravimetrisch
2	Belcher-Typ	offenes Rohr, 800—950° C	50	a) gravimetrisch b) maßanalytisch
3	Lindner-Typ	gefülltes Rohr, 600—800° C	20—25	maßanalytisch $H_2O + R\text{-}POCl_2 \rightarrow 2\,HCl$ $CO_2 + Ba(OH)_2 \rightarrow BaCO_3$
4	Johansson-Typ	gefülltes Rohr, 900° C	10	maßanalytisch H_2O: Karl Fischer $CO_2 - BaCO_3 - Ba(JO_3)_2 - 6\,J_2$
5	Unterzaucher-Typ	gefülltes Rohr, 900° C	10	maßanalytisch $H_2O - CO - J_2$ $CO_2 - CO - J_2$
6	manometrisch (Schöniger)	gefülltes Rohr, 850—900° C	Vakuum	Druckmessung
7	elektrometrisch (Malissa)	a) gefülltes Rohr Pregl-Typ b) leeres Rohr, 1000—1350° C	5 220	nur C, Leitfähigkeit Leitfähigkeitsdifferenz C, H, S
8	gaschromatographisch	CuO + Probe; Helium 750° C	25	thermische Leitfähigkeit und Planimetrie von CO_2 und C_2H_2
9	radiometrisch (Fe-55)	keine	kein	Absorption von Röntgenstrahlen
10	Röntgenfluorescenz	keine	kein	Absorption von sekundären, ultraweichen Röntgenstrahlen

Obwohl nach dieser Aufstellung zur Messung die verschiedensten Endprodukte zur Verfügung stehen, hat sich in der Praxis — und vor allem in der Industrie — fast nur die Messung von Kohlendioxid und Wasser durchsetzen können.

Bei der Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmung ist das Wägen der Absorptionsgefäße das Hauptbelastungsmoment der bisher üblichen Bestimmungsmethoden. Durch das Anpassen an das Wägeklima ist ein großer Zeitbedarf erforderlich, und resultierend aus der Diskrepanz zwischen dem Gewicht der Absorptionsröhrchen und dem Gewicht der absorbierten Gaskomponenten, meist im Verhältnis von 1 : 5000 bis 1 : 10000, liegt eine große Fehlermöglichkeit. Die eigentlichen Verbrennungsvorgänge benötigen selten mehr als 10 min, also $^1/_6$ bis $^1/_4$ der Gesamtanalysenzeit. Der Hauptteil der restlichen Zeit geht als Wartezeit und als Zeit zur Konstanzwägung der Absorptionsröhrchen verloren. Hier muß also vordringlich eingesetzt werden, wenn eine Zeitverkürzung erreicht werden soll und wenn man an eine echte Automatisierung denkt.

Bereits 1920 befaßte sich LINDNER[9] intensiv mit der Möglichkeit der maßanalytischen Bestimmung von Kohlenstoff und Wasserstoff, wobei der Kohlenstoff als Kohlendioxid in Barytlauge und der Wasserstoff als Wasser nach Durchgang durch ein Reaktionsröhrchen gefüllt mit Naphthyloxychlorphosphin als Halogenwasserstoff erfaßt wurde. Allerdings war dadurch nur der Wägevorgang ausgeschaltet. Auch die Bemühung von NIEUWENBURG[12] sowie BELCHER und seiner zahlreichen Mitarbeiter[1] um geeignete Reaktionsmittel für die Umsetzung des Wassers blieben hinsichtlich des Zeitbedarfes hinter den gestellten Forderungen zurück.

Eine Änderung der Arbeitsweise in der Mikroelementaranalyse brachten BELCHER u. INGRAM[1c] durch verstärkte Einführung des leeren Rohres, welches sporadisch schon früher in der Literatur[4] auftauchte, wobei die Probe bei einem raschen Gasstrom bei etwa 900° C verbrannt wird. Nach INGRAM[5] gestattet diese Arbeitsweise die Erfassung des Kohlenstoffes und Wasserstoffes in 25 min.

UNTERZAUCHER[19] hat in Weiterentwicklung seiner Sauerstoffbestimmungsmethode auch ein maßanalytisches Kohlenstoff- und Wasserstoff-Bestimmungsverfahren bekanntgegeben, wobei sowohl das bei der Verbrennung erzeugte Kohlendioxid, als auch das Wasser nach Reduktion im Kohleofen zu Kohlenmonoxid und nachfolgender Aufoxydierung jodometrisch erfaßt werden.

Beim maßanalytischen Verfahren von JOHANSSON[6] wird zur C-H-Bestimmung folgender Weg eingeschlagen: Die Verbrennung findet im leeren Rohr bei etwa 900° C statt, wobei aus dem Kohlenstoff Kohlendioxid gebildet wird, welches zu Bariumcarbonat umgesetzt und abfiltriert wird. Das Bariumcarbonat wird in das entsprechende Jodat überführt und daraus dann das Jod maßanalytisch erfaßt. Das Wasser wird in einer Mischung von Methanol und Pyridin aufgefangen und nach KARL FISCHER titriert. Ein wesentlicher Zeitgewinn kann hier, bedingt durch die Abfiltration des Bariumcarbonats allein schon nicht enthalten sein.

Darüber hinaus sei auch auf die manometrischen Kohlenstoff- und Wasserstoff-Bestimmungsmethoden hingewiesen, wobei das Ausfrieren und Wiederauftauen des Wassers und Kohlendioxydes und entsprechende Druckmessungen die Grundlagen des Verfahrens bilden. SCHÖNIGER[15] beschreibt eine derartige Kohlenstoff-, Wasserstoff- und Stickstoffbestimmungsmethode, wobei die Forderung nach Fortfall der vielen, bei der gravimetrischen Methode notwendigen Wägungen bereits erfüllt ist. Die organische Substanz wird in einem geschlossenen, auf mindestens 10^{-2} mm Quecksilber evakuierten System nach Vermischen mit Kupferoxid zu Kohlendioxid, Wasser und Stickstoff verbrannt. Die beiden ersten Produkte werden fraktioniert ausgefroren, so daß der verbleibende Restdruck dem Stickstoffgehalt

der Substanz entspricht. Nach dem Abpumpen des Stickstoffes und dem Auftauen des Kohlendioxids wird der Kohlendioxiddruck gemessen und anschließend der Wasserdampfdruck. Aus den einzelnen Drucken ergibt sich dann der Gehalt an Kohlenstoff, Wasserstoff und Stickstoff.

Die manometrische C-H-Analyse von, mit markierten (^{14}C und ^{3}H) Elementen versehenen organischen Verbindungen, beschreibt Simon[16] und diese Z. 181, 85 (1961).

In jüngster Zeit wurden von Sundberg u. Maresh[18] sowie Duswalt u. Brandt[3] gaschromatographische Verfahren beschrieben, wobei das Kohlendioxid als solches und das Wasser nach Konversion über Calciumcarbid zu Acetylen an Silicagel adsorbiert und mit Helium eluiert werden. Diese Arbeitsweise, die noch in den Anfängen steckt, ist derzeit nicht nur mit einem empfindlichen hohen relativen Fehler behaftet, sondern auch mit einem Zeitbedarf von etwa 40 min, wovon die Hälfte wiederum auf die Verbrennungszeit geht.

Es ist naheliegend, im Hinblick auf die Automatisierung auf die Verbrennung überhaupt zu verzichten. Auch hier gibt es Möglichkeiten, die sehr aufmerksam verfolgt werden sollten, auch wenn sie im Augenblick für die Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmung noch keine Bedeutung haben. Man kann entweder durch Verwendung radioaktiver Isotope, z. B. Eisen-55 oder Strontium-90, wie dies Wiberley[21] beschreibt, oder nach einem Patent der Philips-Gesellschaft, wobei unter Benutzung weicher Röntgenstrahlen analysiert wird, vorgehen.

Seitdem Cain u. Maxwell[2] die durch Einleiten von Kohlendioxid in Alkalilauge beobachtete Leitfähigkeitsänderung zur Kohlenstoffbestimmung herangezogen haben, wurde auch dieser Reaktionsmechanismus, wenn auch bei weitem nicht so wie die gravimetrische Arbeitsweise, in Betracht gezogen. Erst seit 1950 rückte sie mehr in den Vordergrund, wobei vor allen Dingen von seiten der Eisenhüttenchemie viele Beiträge gebracht wurden.

Es ist zweifelsohne richtig, die Leitfähigkeit als Indikation heranzuziehen, da sie praktisch ohne Verzögerung den Eintritt der chemischen Reaktion zwischen Verbrennungsgasen und Absorptionslösungen anzeigt, und so nach dem heutigen Stand der Meßtechnik sehr leicht eine automatische Registrierung gestattet. Das Problem der raschen, genauen und zur Automatisierung geeigneten Kohlenstoff-, Wasserstoff- und Schwefelbestimmung sieht nach meinen Gesichtspunkten etwa folgend aus:

1. Sichere und rasche Verbrennung der Substanz unter Berücksichtigung der dabei eventuell entstehenden Spalt- und Nebenprodukte.
2. Ausschaltung aller Wägevorgänge, vorläufig noch mit Ausnahme der Einwaage.
3. Erzeugung von Leitfähigkeitsänderungen hervorrufenden spezifischen Verbrennungsprodukten.
4. Schaffung einer geeigneten Apparatur.

2. Die Verbrennung

Die Verbrennung von einfachen organischen Substanzen im hochgereinigten Sauerstoff bringt je nach Zusammensetzung und Temperatur eine mehr oder weniger große Anzahl von gasförmigen Produkten, wie z. B. Kohlendioxid, Schwefeldioxid, Schwefeltrioxid, Stickstoff, Stick-

oxide usw. Diese Produkte sind mehr oder weniger thermisch dissoziiert, wobei diese Dissoziation außer vom Druck und der Temperatur auch davon abhängig ist, ob Katalysatoren vorhanden sind, d. h. also, ob im „gefüllten" oder „leeren" Rohr verbrannt wird. Leider fehlen für die Mikroelementaranalyse noch neuere eingehende Untersuchungen, z. B. wie sie für die Stickstoffbestimmung nach Dumas, von KAO u. WOODLAND[7] durchgeführt wurden. Betrachten wir aber kurz die Vorgänge bei der Verbrennung von Kohlenstoff, Wasserstoff, Schwefel und Stickstoff enthaltenden Substanzen im leeren Rohr an Hand der einfachen Reaktionsgleichungen.

$$C + O_2 \rightarrow CO_2 + 94{,}3 \text{ kcal} \quad (1)$$

$$S + O_2 \rightarrow SO_2 + 69{,}3 \text{ kcal} \quad (2)$$

$$2\,H + 1/2\,O_2 \rightarrow H_2O + 57{,}12 \text{ kcal} \quad (3)$$

$$N_2 + O_2 \rightarrow 2NO - 42{,}2 \text{ kcal} \quad (4)$$

Diese so einfach hingeschriebenen Reaktionsgleichungen sind in Wahrheit oft über viele Zwischenstufen laufende Kettenreaktionen und sollen hier nicht abgehandelt werden. Wir haben im Augenblick auch nicht viel davon, wenn wir die einzelnen dazugehörigen Gleichgewichtskonstanten betrachten, wie dies auch bereits geschehen ist[11]. Um von der theoretischen Seite her einigermaßen Klarheit zu bekommen, müßten viele Gleichgewichtslagen zwischen 800° und 1400° C im Sauerstoffstrom matrizenartig durchgerechnet werden. Bisher kann nach den empirischen Ergebnissen und einfacher Berücksichtigung der einzelnen Gleichgewichte aber gesagt werden, daß bei etwa 1200°C die thermische Dissoziation von Kohlendioxid und Wasser praktisch keine Rolle spielt. Weiter ruft etwa gebildetes Schwefeltrioxid, da bei Rotglut thermisch bereits so weit gespalten, daß nur mehr Schwefeldioxid vorliegt, keine Störungen hervor. Zur thermischen Zerlegung von Wasser wäre noch zu sagen, daß nach spektroskopischen Daten bei 1227°C nur $1{,}9 \cdot 10^{-2}$ % des Wassers in Wasserstoff und Sauerstoff gespalten sind. Für die Oxydation des Stickstoffes zu Stickoxiden, die nach einer stark endothermen Reaktion abläuft, gilt, daß bei 727°C $3{,}06 \cdot 10^{-3}$ und bei 1727°C nur 0,83 Vol.-% Stickoxid vorliegt. Das heißt also, daß der Stickstoff, soweit er als solcher vorliegt, bei 1200°C ohne Katalysatoren keine wesentliche Oxydation erleidet.

3. Die Absorption und die Leitfähigkeitsänderung

Die Absorption gasförmiger Reaktionsprodukte in Elektrolyten und die damit verbundene Leitfähigkeitsänderung ist eine Funktion der Natur des Elektrolyten, des Lösungsmittels, der Temperatur und der Konzentration. Es spielen vorwiegend dabei die spezifische Leitfähigkeit, die Temperaturbeziehung und die Äquivalentleitfähigkeit eine große

Rolle. *Wenn* nun die chemische Umsetzung zwischen zu absorbierenden Komponenten und dem Elektrolyten *quantitativ und schnell* abläuft, so ist die Leitfähigkeitsmessung, da sie *trägheitslos* und einfach durchgeführt werden kann, die geeignetste Meßmethode und läßt sich vorzüglich zur automatischen Registrierung heranziehen.

Die meßbaren Änderungen sind zum Teil sehr klein und es ist deshalb nötig, auf besondere physikalische Eigenschaften der Lösung Rücksicht zu nehmen. Hier ist vor allem der Temperatureinfluß auf die Leitfähigkeit zu betrachten. Mit steigender Temperatur nimmt z. B. die Leitfähigkeit einer n/200 KOH von 1155 μ Siemens bei 20°C auf 1372 μ Siemens bei 30°C praktisch linear zu. Die Linearität bleibt auch beim Abkühlen erhalten und der Temperatureinfluß liegt im Mittel bei etwa 2% je Grad. Um aber jeglichen Temperatureinfluß zu eliminieren, ist es notwendig, zur Differenzmessung überzugehen und die Elektrodenpaare auf gleicher Temperatur zu halten. Diese Arbeitsweise, wie auf S. 54—59 und in den Arbeiten[8,10,11,13b,14] näher beschrieben, soll *Relativ-Konduktometrie* benannt werden. Bezüglich der Grundlagen des Meßgerätes siehe S. 54.

4. Die Absorption von Kohlendioxid

Bekanntlich nehmen viele Alkali- und Erdalkalihydroxide begierig Kohlendioxid unter Carbonatbildung und Wasserspaltung auf. Allerdings scheint die Absorption, die außer von der Natur und der Temperatur des Elektrolyten auch von der Gasdurchströmgeschwindigkeit abhängig ist, nie quantitativ zu verlaufen. Die in jüngster Zeit in einem Firmenprospekt angeführte Behauptung der 100%igen Absorption in einer $Ba(ClO_4)_2$-Lösung und besonderem Rührsystem hielt einer objektiven Prüfung nicht stand.

Durch Anwendung eines genau und konstant arbeitenden Pumpensystems ist es aber möglich, in der Zeiteinheit immer gleiche Gasvolumina durch die Meßzelle zu bringen und diesen oben erwähnten Nachteil auszuschalten. Schmidts u. Baasch[14] haben ein derartiges System geschaffen und damit mitgeholfen, die Kohlenstoff-, Wasserstoff-, Schwefel- und Stickstoffbestimmung in Grubengasen sowie in Eisenwerkstoffen und in neuester Zeit sogar auch in der Mikroelementaranalyse auf eine neue Basis zu stellen. Alle Absorptionslösungen auf Laugenbasis führen zur Leitfähigkeitsverminderung, da es auf Grund der chemischen Reaktion immer zum *Verlust von Hydroxylionen* kommt. Die oftmals vorgeschlagene und auch verwendete Barytlauge bildet trotz oder besser gesagt wegen der Bildung der schwer löslichen Bariumcarbonate keine bessere Absorptionslösung, da sich das abgeschiedene Salz sehr leicht an den Elektroden absetzt und dadurch Anlaß zu häufigen Störungen und Reinigungen gibt. Zur Zeit hat sich eine 0,005n Natronlauge durchaus brauchbar erwiesen[11].

5. Die Absorption des Wassers

Bei der Bestimmung des zu Wasser verbrannten Wasserstoffes wird gegenwärtig gar nicht die Absorption des Wassers in einer Absorptionslösung herangezogen, sondern es wird versucht, immer eine chemische Umsetzung, die zu einem absorbierbaren Gas und zu einer Leitfähigkeitsänderung führt, heranzuziehen. Selbstverständlich ist es grundsätzlich möglich, das Wasser direkt zu absorbieren. In konzentrierter Schwefelsäure z. B. geht, soweit es sich um geringe Wassermengen handelt, die Leitfähigkeit direkt proportional mit der Wasseraufnahme. LINDNER[9] hat den Reaktionen zwischen Wasser und halogenabspaltenden Reagentien im Laufe von mehr als 10 Jahren große Aufmerksamkeit geschenkt, ohne dabei eigentlich wirklich zu einer Schnellbestimmung zu gelangen. Wohl gelang ihm aber die Ausschaltung der Absorptionsröhrchenwägung, ein Zeitgewinn war aber bei seiner Methode allerdings nicht enthalten, ebensowenig eine höhere Genauigkeit. Wie bereits in einer früheren Arbeit[11] mitgeteilt, bieten sich eine Reihe anderer als von LINDNER angewandter Reagentien an, die teilweise schon untersucht sind, teilweise aber noch immer erprobt werden.

Bezüglich der mit Wasser, Ammoniak bildenden Nitride sei vermerkt, daß sich nur Lithiumnitrid und Magnesiumnitrid von kaltem Wasser zersetzen, die Erdalkalinitride durch heißes Wasser und Bor- bzw. Aluminiumnitride im Gasstrom. Azide reagieren wahrscheinlich zu heftig, mit Amiden liegen noch keine Erfahrungen vor. Bei der Auswahl der mit dem Wasser zur Reaktion zu bringenden Reagentien muß auch immer daran gedacht werden, mögliche Nebenreaktionen tunlichst zu vermeiden. Selbstverständlich wurden auch Versuche mit dem Karl-Fischer-Reagens angestellt, aber schon das Durchleiten eines getrockneten Sauerstoffstromes führte zu einer starken Abwanderung des Zeigers, die auch durch Einleiten von wasserhaltiger Luft nicht merklich gesteigert werden konnte. Günstig erscheint immer die Erzeugung eines leicht verbrennbaren Gases, z. B. Methan, Äthan oder Acetylen. Das Calciumcarbid und selbstverständlich auch andere Carbide, die sich sofort mit Wasser umsetzen, bieten sich in erster Linie dafür an, worüber bereits berichtet wurde[11]. In der Zwischenzeit sind auch auf anderer Seite, insbesondere von der gaschromatographischen Seite[18] her, auch Versuche mit Calciumcarbid gemacht worden. Allerdings ist das Calciumcarbid des Handels ein relativ unreines Produkt, die Verunreinigung stört aber nach Durchgang des Reaktionsganges durch einen Austauscher nicht. Eine überschlagsmäßige Überlegung der Verwendung von Aluminiumcarbid an Stelle von Calciumcarbid zeigt, daß dieses auf Grund seiner chemischen Reaktion, da es Methan bildet, reaktionsunempfindlicher ist, als das Calciumcarbid.

Nachdem sich nun die Umsetzung als brauchbar erwiesen hatte, war, um Störungen durch in der Praxis der Mikroelementaranalyse vorhandene Kohlendioxid zu umgehen, dafür zu sorgen, daß nur aus der Acetylenverbrennung stammendes Kohlendioxid in die Meßzelle gelangen kann. Zu diesem Zweck muß entweder das Wasser aus den Verbrennungsprodukten der Substanz entnommen oder ein Absorptionsmittel gefunden werden, das wohl Kohlendioxid, aber nicht Acetylen absorbiert. Beide Wege wurden mit Erfolg beschritten. Bekanntlich nimmt wasserfreies Kupfersulfat oder Bariumchlorid leicht wieder Wasser auf. Das bei der Verbrennung entstandene Wasser wird also an wasserfreies Kupfersulfat gebunden, das Kohlendioxid abgesaugt und später durch Erhitzen des Kupfersulfates auf 450°C das Wasser wieder freigemacht und bestimmt. Ein weiterer Weg würde sich unter Umständen auch anbieten, indem man das bei der Verbrennung gebildete Wasser ausfriert und langsam wieder auftaut. Im Sinne unserer Bestrebungen liegt es aber, einen möglichen Zeitgewinn nicht außer acht zu lassen. Durch die Absorption des Wassers ist aber immer ein Zeitverlust in Rechnung zu setzen, gleichgültig ob das Wasser an entwässertes Kupfersulfat, Bariumchlorid gebunden oder ob das Wasser ausgefroren wird. Natronasbest ist bekanntlich ein vorzügliches CO_2-Absorptionsmittel und läßt, wie unsere Untersuchungen gezeigt haben, das Acetylen quantitativ passieren. Somit war auch der raschere Weg frei und die Wasserbestimmung sieht demnach wie folgt aus: Die organische Verbindung wird bei etwa 1000—1200°C im reinsten Sauerstoffstrom verbrannt. Das dabei entstehende Wasser wird über Calciumcarbid geleitet und das entstehende Acetylen und die Nebengase gehen durch Natronasbest, wobei Kohlendioxid und die störenden Nebengase absorbiert werden. Anschließend wird das Acetylen bei etwa 1000°C im reinsten Sauerstoffstrom zu Kohlendioxid verbrannt, wobei die unter (5) und (6) angeführten Reaktionsgleichungen eine Rolle spielen könnten.

$$CaC_2 + H_2O \rightarrow C_2H_2 + CaO \quad (5)$$

$$CaC_2 + 2\,H_2O \rightarrow C_2H_2 + Ca(OH)_2 \quad (6)$$

$$C_2H_2 + O_2 \rightarrow 2\,CO_2 + H_2O \quad (7)$$

$$1\,H_2O \rightarrow 1\,C_2H_2 \rightarrow 2\,CO_2 \quad (8)$$

$$1\,H \ldots\ldots\ldots\ldots 1\,CO_2 \quad (9)$$

$$2\,H_2O \rightarrow 1\,C_2H_2 \rightarrow 2\,CO_2 \quad (10)$$

$$1\,H \ldots\ldots\ldots\ldots 1/2\,CO_2 \quad (11)$$

Das heißt also, als Meßgröße werden nach (5), (7) und (8) je Mol Wasser 2 Mole Kohlendioxid erzeugt, welche nach den gleichen Grundsätzen wie bei der Kohlenstoffbestimmung erfaßt werden, so daß schließlich nach (9)

für 1 Wasserstoff-Atom 1 Mol CO_2 erfaßt werden kann. Verläuft die Reaktion aber nach (6), (7) und (10), so wird für ein Atom Wasserstoff nach (11) aber nur $^1/_2$ Mol Kohlendioxid entwickelt.

Die einzelnen Meßergebnisse, die zur Wasserstoffbestimmung über den Acetylenweg führen, sind bereits publiziert[11] und sollen hier nicht weiter erörtert werden.

Da sich aber an der Reaktionszone Wasser-Carbid je nach Wassermenge immer Calciumoxid oder Calciumhydroxid bildet, und dieses zu Störungen Anlaß geben kann, wurde eine einfache — in Abb. 1 dargestellte — aus einer Reihe kleiner mit Calciumcarbid gefüllter U-Röhrchen bestehende Wechselvorrichtung geschaffen, die es gestattet, durch einfaches Drehen das Wasser enthaltende Verbrennungsgas immer mit frischem Calciumcarbid zur Reaktion zu bringen.

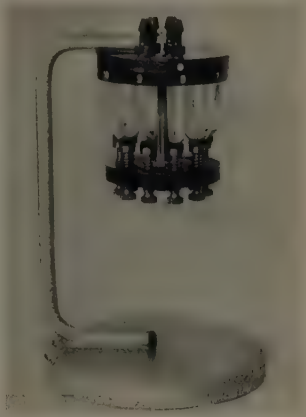


Abb. 1. Carbid-Wechselvorrichtung

Damit wäre prinzipiell ein gangbarer Weg zur *raschen und vollautomatischen C-H-Bestimmung* aufgezeigt. Vor allen Dingen dann, wenn man darangeht, die Arbeitsweise von Unterzaucher[20] über die Bestimmung der *Verhältnisse* von Kohlenstoff zu Wasserstoff auf unsere Arbeitsweise zu übertragen. Der einzuschlagende Weg wäre folgender:

Kleine Mengen der organischen Substanz werden *ohne vorherige Wägung* in den Mikroplatintiegeln oder in anderer geeigneter Form der Verbrennung im leeren Rohr unterworfen. Nach den bisherigen Schilderungen erhalten wir sowohl für den Kohlenstoff als auch für den Wasserstoff die gleiche Gaskomponente, und zwar bekommen wir für 1 Kohlenstoff 1 Mol CO_2 und für 1 Wasserstoff $^1/_2$ Mol oder 1 Mol CO_2. Es bedarf also nur eines unwesentlichen elektrotechnischen Kunstgriffes, um das Verhältnis von Kohlenstoff zu Wasserstoff ablesen zu können.

6. Die Absorption von Schwefeldioxid

Da die Verbrennungsgase organischer Kohlenstoff, Schwefel und Wasserstoff enthaltender Verbindungen neben Schwefeldioxid auch Kohlendioxid enthalten, muß zur Absorption von Schwefeldioxid grundsätzlich eine Absorptionslösung verwendet werden, in der Kohlendioxid nicht gelöst oder zumindest keine Störung der durch Schwefeldioxid hervorgerufenen Leitfähigkeitsänderung verursacht wird. Gemeinsam mit Koch u. Eckhard[8] wurde über die Prüfung geeigneter Absorptions-

lösungen bereits an anderer Stelle ausführlich berichtet und später[13b] auch über die Anwendbarkeit dieses Reaktionsmechanismus zur S-Bestimmung in organischen Verbindungen. Die Empfindlichkeit des Verfahrens ist in hohem Maße von der Säurekonzentration in der Absorptionslösung abhängig. Je geringer diese gehalten werden kann, um so größer ist die Empfindlichkeit. Allerdings darf man aber den zur Austreibung des Kohlendioxids notwendigen niedrigen p_H-Wert nicht überschreiten.

7. Die Apparatur

Darüber wurde ebenfalls schon berichtet[11]. Abb. 2 zeigt den schematischen Aufbau der Apparatur und Abb. 3 den Anblick der vollständigen Versuchseinrichtung. Sie besteht im wesentlichen aus folgenden Hauptteilen:

1. Der Verbrennungseinrichtung mit Luft- oder Sauerstoffreinigung,
2. dem Pumpensystem,
3. den Meßzahlen und
4. den Registriereinrichtungen.

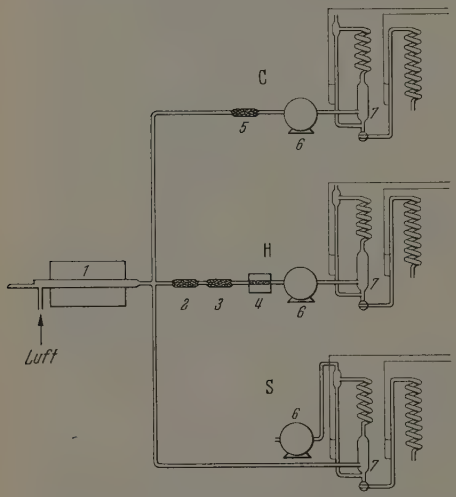


Abb. 2. Schema 1 der C-, H- und S-Bestimmung. *1* Verbrennungsofen; *2* Acetylenerzeugung; *3* Natronkalk; *4* Acetylenverbrennungsofen; *5* Lewatit; *6* Pumpen; *7* Absorptionszellen

Grundsätzlich kann jede Verbrennungseinrichtung, die die notwendige Temperatur erreicht, verwendet werden. Wichtig ist bei dieser Arbeitsweise, daß das Verbrennungsrohr, ein Porzellan-, Hartglas-, Quarzglas- oder Platinrohr einseitig verschlossen ist, da sonst das Pumpensystem nicht funktionieren kann. Außerdem ist eine weitere wesentliche Vereinfachung des Verbrennungsrohres möglich, da zumindest nach den bisherigen, aber noch nicht vollständigen Untersuchungen, keine Füllung mit irgendwelchen Chemikalien notwendig ist. Die in der Stahl- und Eisenindustrie üblichen Verbrennungseinrichtungen haben sich auch bei Untersuchungen organischer Verbindungen sehr gut bewährt. Selbstverständlich kann aber bei der anorganischen Kohlenstoffanalyse das für besonders hohe Temperaturen notwendige Porzellanrohr durch ein Hartglasrohr entsprechender Abmessung ersetzt werden. An Stelle der Por-

zellanschiffchen ist es zweckmäßig, die blindwertärmeren Platintiegel oder -schiffchen zur Aufnahme des Analysengutes zu verwenden. Weiter wurde speziell für die Mikroanalyse ein kleiner elektrischer Verbrennungsofen eingebaut, der sowohl in senkrechter, als auch in waagrechter Lage verwendet werden kann. Bei hohen Temperaturen kommt es sehr oft zu explosionsartigen Verbrennungen. Wie Versuche mit vielen organischen Verbindungen, aber auch mit anorganischen, wie z. B. Wolfram- und Molybdäncarbid gezeigt haben, hat ein so heftiger Verbrennungsvorgang auf die Bestimmung der gasförmigen Komponenten keinen nachteiligen Einfluß, wohl aber auf die eventuelle Analyse der Metallrückstände. Bei der plötzlichen Verbrennung wird nun ein Teil des Materials fein zerstäubt und geht so einer Rückstandsbestimmung verloren. Vollständige

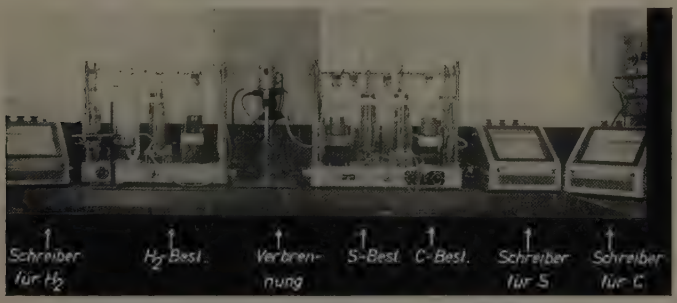


Abb. 3. Versuchsanordnung zur gemeinsamen C-, H- und S-Bestimmung

Zersetzung findet auf jeden Fall statt. Das plötzliche Auftreten hoher Kohlensäure- bzw. Schwefeldioxid-Konzentrationen hat keinen nachteiligen Einfluß, da das Pumpensystem stark genug ist, um die Gase abzusaugen. In jüngster Zeit wurde auch versucht, den Mikroplatintiegel mit Hilfe eines kleinen Hochfrequenzofens direkt zu erhitzen. Im Prinzip funktioniert diese Arbeitsweise und die Frage scheint auch gelöst zu sein.

Einer der wichtigsten Bestandteile der ganzen Apparatur ist das Pumpensystem, das die bei der Verbrennung entstandenen Gase unter konstantem Druck absaugt und in die Meßzelle befördert. Für diese Meßzelle, d. h. für jede Gaskomponente ist derzeit noch ein eigenes Pumpenaggregat notwendig. Wie bereits erwähnt, ist die Umsetzung zwischen der Absorptionslösung und dem Kohlendioxid z. B. nicht vollständig, daher muß unter allen Umständen für konstante Gasförderung gesorgt werden. Der mit einer Strömungsgeschwindigkeit von 3 l/min eingeführte, gereinigte Sauerstoffstrom ist wesentlich rascher als der von der Pumpe abgesaugte Gasstrom, so daß noch ein großer Teil des Sauerstoffes das Rohr an

der Beschickungsseite verläßt und dabei das Eindringen von Außenluft verhindert. Dadurch ist eine wesentliche Vereinfachung der gesamten Kohlenstoffbestimmungsapparatur gefunden worden, da kein Verschluß nach dem Einschieben des mit dem Analysengut beschickten Platintiegels betätigt werden muß. Das kohlensäurehaltige Verbrennungsgas wird vor Eintritt in die Pumpe noch durch ein mit einem Absorber gefülltes Absorptionsröhrchen geleitet, in dem die bei der Verbrennung entstehenden schädlichen Nebengase absorbiert werden. Da z. B. Schwefeldioxid die Leitfähigkeit der Natronlauge ebenfalls beeinträchtigt, muß es bei der Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmung vollständig entfernt werden. Die Absorption muß vor der Pumpe erfolgen, um ein Verschmutzen des Öles mit Schwefeldioxid zu vermeiden, denn die Öle lösen Schwefeldioxid und geben es langsam wieder ab. Die Meßpumpe saugt eine konstante Gasmenge von 227 ml/min an und befördert es unter einem Druck von 80 mm Quecksilber in den Reaktionsteil der Meßzelle.

Die Umsetzung zwischen Gaskomponente und Absorptionslösung findet in den Meßzellen statt, die prinzipiell gleich aufgebaut sind. Um an den Meßstrecken gleiche Temperaturen sicherzustellen, befindet sich, wie bereits erwähnt, nicht nur diese, sondern auch die Glaswendel und der Reaktionsteil in einem Ölbad, das durch Einblasen von Luft dauernd umgewälzt wird und für eine möglichst genaue Temperaturgleichheit sorgt, da bereits, wie bekannt, ein Grad Temperaturdifferenz eine Änderung der Leitfähigkeit um 2% zur Folge hat. Die Meßzelle wird mit einer definierten Menge Lösung beschickt. Diese Lösung gelangt zunächst in die unbegaste Elektrodenstrecke, die zum Vergleich benutzt wird, dann in das Reaktionssystem, in dem die Begasung und die Umsetzung stattfindet und von hier nach Abscheidung des Gases in die zweite Meßstrecke. Diese Meßstrecke ist mit dem Begasungsraum verbunden, so daß eine dauernde Zirkulation stattfinden kann. Das Gas treibt die Lösung im Kreis herum, wird jedoch einwandfrei durch einen Dephlegmator von der Lösung getrennt. Findet nun ein Umsatz in der Begasungskammer statt, so ändert sich die Leitfähigkeit in der zweiten Meßstrecke und bewegt sich entsprechend der Größenordnung, und zwar so lange, bis kein reaktionsfähiges Gas mehr vorhanden ist. Durch Verwendung der verschiedensten Lösungskonzentrationen können beliebige Meßbereiche erzielt werden. Man hat es also in der Hand, durch richtige Wahl der Konzentration jeden Meßbereich einzurichten. Da die Messung im Endeffekt elektrisch erfaßt wird, lassen sich aber auch noch mittels physikalischer Mittel Meßbereiche umschalten, und zwar auch während der Messung. Darüber hinaus ist es auch noch möglich, die Meßpumpe so einzurichten, daß das Meßgas geteilt wird, z. B. im Verhältnis 1 : 9, d. h. 90% des Meßgases werden verworfen und nur 10% gelangen in die Meßzelle. Hierdurch ist dann der Meßbereich auf das 10fache erweitert. Die

Änderung der Gasteilung wird durch Umlegung eines Hahnes in einfachster Weise bewerkstelligt.

Die Leitfähigkeitsänderung wird als Differenzwert zwischen begaster und nichtbegaster Elektrode nach elektrischer Verstärkung auf einen Kompensationslinienschreiber übertragen und aufgezeichnet. Wenn sich in beiden Meßstrecken frische Lösung befindet, so stellt sich der Zeiger bzw. der Schreiber auf den Nullpunkt bzw. auf den Blindwert ein. Der Nullpunkt kann mit Hilfe von Potentiometern in verhältnismäßig weiten Grenzen stufenlos verändert werden. Durch eine besondere Vorrichtung kann die Empfindlichkeit sowohl am elektrischen Teil als auch am Leitungssystem verändert werden.

8. Einige grundlegende Untersuchungen

Nachdem die ersten Grundlagen zur Simultanbestimmung von Kohlenstoff, Wasserstoff und Schwefel geschaffen waren, war der Zeitpunkt der stufenweisen und vergleichenden Untersuchungen gekommen.

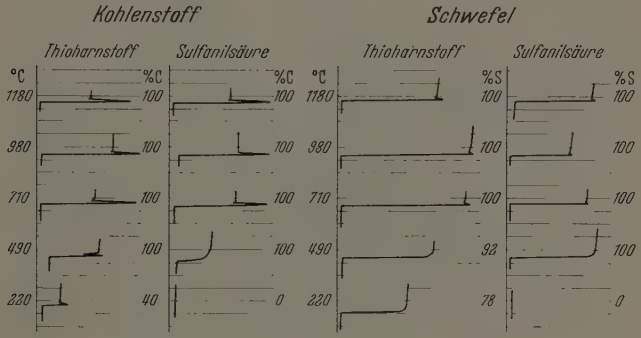


Abb. 4. Verbrennungseigenschaften und Temperatur

Naturgemäß wurde mit der Kohlenstoffbestimmung begonnen. Es war vorerst die Frage zu klären, bei welchen Temperaturen im offenen Rohr eine vollständige Verbrennung von Kohlenstoff eintritt. Dabei wurde schon die Feststellung gemacht, daß der Kohlenstoff je nach Verbindung mehr oder weniger rasch bei der einzelnen Temperatur entbunden und verbrannt wird. Während z. B., wie Abb. 4 es zeigt, aus Thioharnstoff schon bei 220°C etwa 40% des Kohlenstoffes erfaßt werden kann, ist dies bei der Sulfanilsäure keineswegs der Fall. Ab etwa 700°C werden aber sowohl aus Thioharnstoff als auch aus Sulfanilsäure Kohlenstoff und Schwefel quantitativ entbunden. Bei 800°C gibt Glucose erst 93—94% des darin enthaltenen Kohlenstoffes, über 1000°C jedoch vollständig ab. Dies zeigt auch deutlich Tab. 2, wo die nach statistischen

Gesichtspunkten durchgeführten Verbrennungen zusammengefaßt sind. Weiterhin sieht man aber daraus, daß eine Verbrennungstemperatur von 1200°C keineswegs einen ungünstigen Einfluß auf die Erfaßbarkeit des Kohlenstoffes ausübt. Ähnliche Versuche wurden auch mit isolierten und synthetisch hergestellten Carbiden, also Verbindungen, die keinen Wasserstoff, keinen Schwefel und Stickstoff enthalten, mit gleich guten Ergebnissen erhalten.

Tabelle 2. *Verbrennung von 1 mg Glucose im leeren Rohr in O_2.* (227 ml/min)

Verbrennungstemperatur °C	Faktor: $\frac{\mu g\ C}{mm}$	Standardabweichung s	Varianz: V (in %)
700	3,75	0,173	4,62
800	3,74	0,069	1,87
1000	3,66	0,067	1,83
1200	3,68	0,070	1,89

Stuck[17] hat vor kurzer Zeit bereits über die Brauchbarkeit des hier aufgezeigten Meßprinzips zur Mikro-C-Bestimmung in Betriebslaboratorien der organischen Industrie berichtet und kommt unter Verwendung der bei der Mikro-C-H-Bestimmung am häufigsten benutzten Verbrennungseinrichtungen (mit Laufbrenner usw.) bei Analysenzeiten von etwa 10 min zu gleich guten Werten wie bei der üblichen Pregl-Methode.

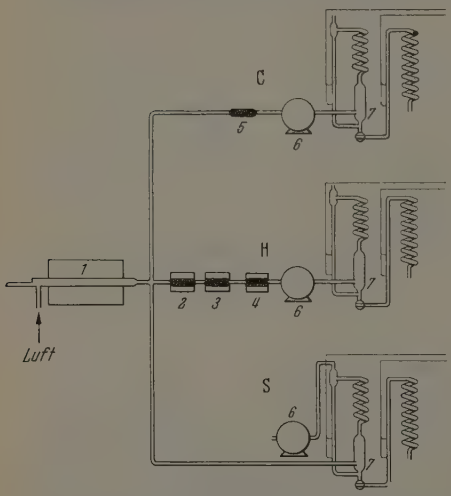


Abb. 5. Schema 2 der C-, H- und S-Bestimmung. *1* Verbrennungseinrichtung; *2* Cu-Ofen; *3* C-Ofen; *4* J_2O_5; *5* SO_2-Absorber; *6* Pumpen; *7* Meßstrecken

Es steht außer Zweifel, daß sich durch Erhöhung der Verbrennungstemperatur bis auf 1200°C und vielleicht sogar darüber, durch vernünftige Gasteilung, entsprechender Wahl der Absorptionslösungen Analysenzeiten von etwa 5 min erreichen lassen.

Bereits im Jahre 1959 wurde anläßlich der Jahrestagung Schweizerischer Mikrochemiker in Zürich über die Einrichtung einer, mit Ausnahme der Einwaage vollautomatischen C-, H- und S-Bestimmungsmethode, wie sie unter Verwendung des Weges nach Unterzaucher[19] für Kohlenstoff und Wasserstoff das Schema in Abb. 5 zeigt, berichtet.

Zusammenfassung

Zur Frage der automatischen Mikroelementaranalyse kann gesagt werden, daß zur Bestimmung des Kohlenstoffes die Verwendung des leeren, aus Keramik bestehenden, etwa 22 mm Durchmesser aufweisenden und über eine Länge von etwa 150 mm auf eine Temperatur von 1200° C gebrachten Rohres bei Einwaagen zwischen 1 und 2 mg Probegut sehr gute Ergebnisse erbrachte. Weiterhin werden Wege aufgezeigt, die die gleichzeitige objektive und quantitative Erfassung von Kohlenstoff, Wasserstoff und Schwefel erlauben.

Literatur

[1a] Belcher, R., J. H. Thompson u. T. S. West: Anal. chim. Acta (Amsterdam) **19**, 148 (1958); vgl. diese Z. **168**, 126 (1959). — [1b] Belcher, R., L. Ottendorfer u. T. S. West: Talanta **4**, 166 (1960). — [1c] Belcher, R., u. G. Ingram: Analyt. chim. Acta (Amsterdam) **4**, 118 (1950); vgl. diese Z. **134**, 367 (1951/52). — [2] Cain, R. J., u. L. C. Maxwell: Ind. Engng. Chem. **11**, 852 (1919); vgl. diese Z. **102**, 202 (1935). — [3] Duswalt, A. A., u. W. W. Brandt: Analyt. Chemistry **32**, 272 (1960). — [4] Fildes, J. E.: Rev. pure appl. Chem. **9**, 117 (1959). — [5] Ingram, G.: Mikrochim. Acta (Wien) **1956**, 877; vgl. diese Z. **153**, 283 (1956). — [6] Johansson, A.: Analyt. Chemistry **26**, 1183 (1954); vgl. diese Z. **147**, 149 (1955). — [7] Kao, Sh.-Sh., u. W. C. Woodland: Mikrochem. verein. Mikrochim. Acta **38**, 309 (1951); vgl. diese Z. **142**, 71 (1954). — [8] Koch, W., S. Eckhard u. H. Malissa: Arch. Eisenhüttenwes. **29**, 543 (1958); vgl. diese Z. **167**, 383 (1959). — [9] Lindner, J.: diese Z. **66**, 305 (1925). — [10] Malissa, H.: Mikrochim. Acta (Wien) **1957**, 553; vgl. diese Z. **160**, 287 (1958). — [11] Malissa, H.: Mikrochim. Acta (Wien) **1960**, 127; vgl. diese Z. **178**, 53 (1960). — [12] van Nieuwenburg, C. J.: Mikrochim. Acta (Wien) **1**, 71 (1937); vgl. diese Z. **115**, 347 (1938/39). — [13] Proceedings of the International Symposium on Microchemistry, Birmingham 1958; Pergamon Press 1959, [a] S. 73—140, [b] S. 97. — [14] Schmidts, W., u. W. Baasch: Forschungsber. Wirtsch.- u. Verkehrsmin. NRW, Nr. 67 (1954). Westd. Verlag Opladen. — [15] Schöniger, W., Mikrochim. Acta (Wien) **1957**, 545; vgl. diese Z. **160**, 303 (1958). — [16] Simon, H., H. Daniel u. J. F. Klebe: Angew. Chem. **71**, 303 (1959); vgl. diese Z. **175**, 63 (1960). — [17] Stuck, W.: Mikrochim. Acta (Wien) **1960**, 421. — [18] Sundberg, O. E., u. C. Maresh: Analyt. Chemistry **32**, 274 (1960). — [19] Unterzaucher, J.: Chem.-Ing.-Techn. **22**, 39 (1950); vgl. diese Z. **132**, 291 (1951). — [20] Unterzaucher, J.: Mikrochim. Acta (Wien) **1957**, 448; vgl. diese Z. **161**, 279 (1958). — [21] Wiberley, J. S.: Microchem. J. **2**, 219 (1958); vgl. diese Z. **171**, 119 (1959/60).

Prof. Dr. H. Malissa, Institut f. analyt. Chemie, Technische Hochschule, Wien VI, Getreidemarkt 9 (Österreich)

Entwicklungslabor der Fa. Heinr. Wösthoff o.H.G., Bochum

Grundlagen der konduktometrischen Kohlenstoffbestimmung

Von

W. Schmidts und W. Bartscher

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 18. November 1960)

Im Bestreben, die Mikroelementaranalyse zu beschleunigen und zu automatisieren sind in den letzten Jahren öfters Leitfähigkeitsmethoden vorgeschlagen und angewandt worden[1–4].

Zur Beurteilung der Vorteile und der Grenzen dieser Verfahren ist es erforderlich, mit den apparativen und meßtechnischen Grundlagen vertraut zu sein.

Das Prinzip der Methoden besteht darin, daß bei der Verbrennung oder auf andere Weise entstandene Kohlendioxid zu absorbieren, wofür sich Natronlauge sehr gut eignet und die entsprechend der Gleichung

$$2\,OH^- + CO_2 = CO_3^{2-} + H_2O$$

eintretende Abnahme der Hydroxylionenkonzentration an Hand der damit verbundenen Abnahme der elektrischen Leitfähigkeit zu messen. Abb. 1 zeigt den Zusammenhang zwischen elektrischer Leitfähigkeit und absorbierter Kohlendioxidmenge einer 0,005 n Natronlauge. Die Funktion läuft bis zu etwa 1 mg Kohlendioxid praktisch linear.

Bekanntlich ist die vollständige Absorption des Kohlendioxids in Laugen, wenn überhaupt, so nur sehr schwer, zu erreichen. Der Absorptionsgrad ist im wesentlichen eine Funktion der Laugenkonzentration, der Länge der Reaktionsstrecke, der Reaktionszeit und der Feinheit der Gasblasen. Letztere ist wiederum vom Durchmesser der Einleitungsdüsen, vom Gasdruck und der Oberflächenspannung des Absorptionsmittels abhängig. Bei den z. B. bei der Mikroelementaranalyse anfallenden geringen Kohlendioxidmengen ist es zur Erreichung einer genügend hohen relativen Leitfähigkeitsänderung (= Leitfähigkeitsänderung bezogen auf die Leitfähigkeit der unverbrauchten Natronlauge) erforderlich, weitgehend verd. Natronlaugen (0,01—0,0025 n) zu verwenden. Bei den z. Z. verwandten Absorptionszellen liegen bei Einhaltung der angegebenen Maximalwerte die Absorptionszahlen in folgender Größe:

NaOH-Konzentration	% Absorption	Maximalwert
0,01 n	94	1 mg CO_2/18 ml
0,005 n	86	0,8 mg CO_2/18 ml
0,0025 n	76	0,6 mg CO_2/18 ml

Bei Konstanthaltung der übrigen Variablen, was durch Ersetzen der üblichen leicht verstopfbaren Gaseinleitungsfritten durch relativ weite Düsen und zeitkonstante Zufuhr des Gases mittels eines Pumpensystems gelingt, sind diese Absorptionszahlen streng reproduzierbar. Es scheint ferner durch Zusatz eines Netzmittels möglich zu sein, eine feinere Blasenauflösung zu erreichen und so die Absorptionszahlen auf nahezu 100% zu erhöhen.

Die zur Messung der Leitfähigkeit im allgemeinen benutzten 2poligen Elektroden ergeben störanfällige Anzeigen. Der angezeigte Wert ist in starkem Maße von der geometrischen Gestalt und der Füllhöhe der Meßgefäße sowie von elektrischen Nebenschlüssen über Flüssigkeitsverzweigungen abhängig. Durch Anwendung einer Meßstrecke, die aus drei in eine Glascapillare eingeschmolzenen platinierten Platinelektroden, von denen die beiden äußeren miteinander verbunden sind, besteht, gelingt es, das elektrische Feld auf eine definierte Strecke zu begrenzen (Abb. 2).

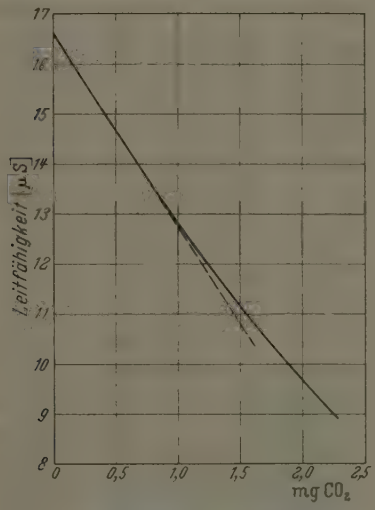


Abb. 1. Abnahme der Leitfähigkeit durch Absorption von Kohlendioxid

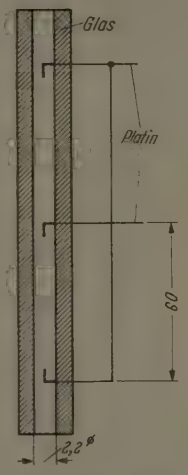


Abb. 2
Dreipolige Meßelektrode

Der elektrische Widerstand dieser Meßstrecken liegt bei Füllung mit 0,005 n Natronlauge bei 60 kΩ. Ein derart hoher Widerstand ist notwendig, um die elektrische Leistung gering zu halten und so Erwärmungen zu vermeiden.

Die Messung der Leitfähigkeit geschieht in einer Wheatstoneschen Brückenschaltung (Abb. 3). R_1 und R_2 sind die durch den Abgriff A unterteilten beiden Seiten eines Potentiometers. R_4 sei die Meßstrecke, welche die zu begasende Natronlauge enthält, R_3 sei eine Meßstrecke, die in ihren geometrischen Abmessungen R_4 gleicht und mit unverbrauchter Natronlauge beschickt ist. Solange die Lauge in R_4 chemisch nicht verändert wird, ist $R_3 = R_4$. Für den Gleichgewichtszustand der Brücke (zwischen A und B tritt keine Spannung auf, $U_d = 0$) gilt:

$$\frac{R_1}{R_2} = \frac{R_3}{R_4}.$$

Es muß also auch $R_1 = R_2$ sein.

Durch Absorption von CO_2 verändert sich der Widerstand R_4. Bei $A - B$ tritt eine Diagonalspannung U_d auf. Diese kann nach elektronischer Verstärkung dazu benutzt werden, einen Motor anzutreiben, der den Abgriff auf $R_1 - R_2$ verändert, bis durch entsprechende Veränderung des Verhältnisses R_1/R_2 das Brückengleichgewicht wieder hergestellt ist ($U_d = 0$). Die dadurch hervorgerufene Lageveränderung des Abgriffs kann als Maß für die Leitfähigkeitsänderung dienen. Die Funktion

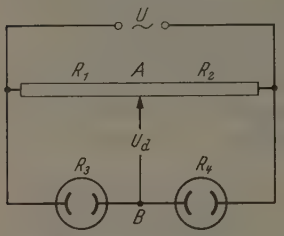


Abb. 3. Wheatstonesche Meßbrücke

Abgriffsänderung = f (Leitfähigkeitsänderung)

verläuft jedoch nicht linear, und dementsprechend werden die Ausschläge auf einer Skala oder an einem Schreiber der Leitfähigkeitsänderung nicht direkt proportional (Abb. 4). Auch läßt sich bei dieser Art der Schaltung ein weiteres elektrisches Eingreifen zur Linearisierung der Funktion oder zur elektrischen Änderung der Anzeigeempfindlichkeit technisch nur schwer verwirklichen.

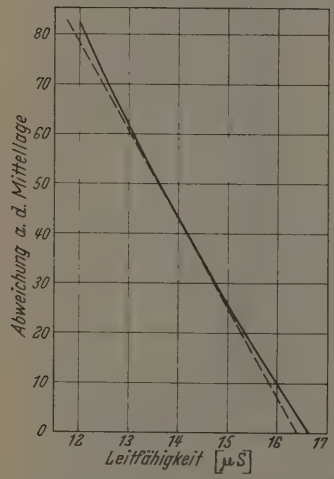


Abb. 4. Darstellung der Funktion: Abgriffsänderung = f (Leitwertänderung). Die gestrichelte Gerade wurde zur Verdeutlichung des nichtlinearen Verlaufs angelegt

Dies gelingt leichter bei einer Auftrennung der Schaltung in einen Meßkreis und einen Kompensationskreis. Das Verhältnis R_1 zu R_2 bleibt bei dieser Art der Messung konstant, während die bei einer Veränderung von R_4 auftretende Diagonalspannung durch eine an einem Kompensographen abgegriffene Spannung kompensiert und registriert wird. Abb. 5 zeigt das Prinzip einer derartigen Schaltung.

Der Zusammenhang zwischen auftretender Diagonalspannung U_d und der Leitfähigkeit L_4 in R_4 ergibt sich durch folgende Überlegung: Über $R_3 + R_4$ fällt die Spannung U ab, über R_4 also die Teilspannung U_t.

$$\frac{U_t}{U} = \frac{R_4}{R_3 + R_4} \qquad U_t = U \cdot \frac{R_4}{R_3 + R_4}.$$

Sofern $R_1 = R_2$ ist, liegt im Punkte A das Potential $U/2$. Die Spannungsdifferenz U_d zwischen A und B beträgt dann:

$$U_d = \frac{U}{2} - U \frac{R_4}{R_3 + R_4}. \tag{1}$$

Durch Einsetzen der Leitfähigkeit $\left(L = \frac{1}{R}\right)$ für die Widerstände $\left(R_3 = \frac{1}{L_3}\right.$; $\left.R_4 = \frac{1}{L_4}\right)$ erhält man:

$$U_d = \frac{U}{2} - U \frac{1}{L_4} \cdot \frac{1}{\frac{1}{L_3} + \frac{1}{L_4}} = U\left(\frac{1}{2} - \frac{1}{\frac{L_4}{L_3} + 1}\right). \tag{2}$$

Die auftretende Diagonalspannung U_d ist also von der Speisespannung U der Brücke und vom Verhältnis der Leitfähigkeiten L_4/L_3 in Meß- und Vergleichselektrode abhängig. Eine Stabilisierung der Speisespannung U ist nicht erforderlich, da sowohl die Speisespannung der Brücke wie auch die des Kompensographen dem gleichen Transformator entnommen werden, so daß Spannungsschwankungen für beide Kreise in gleicher Weise gelten und sich gegenseitig eliminieren. Der Ausschlag am Kompensographen ist also lediglich eine, wenn auch etwas verwickelte Funktion des Leitfähigkeitsverhältnisses L_4/L_3.

Man muß dementsprechend zwischen absoluter und relativer Leitfähigkeitsänderung unterscheiden. Die absolute Leitfähigkeitsänderung ist die zahlenmäßig in „Siemens" ausgedrückte Leitfähigkeitsänderung, die durch Absorption einer bestimmten Kohlendioxidmenge hervorgerufen wird. Diese Zahl ist in gewissen Grenzen (siehe Abb. 1) von der

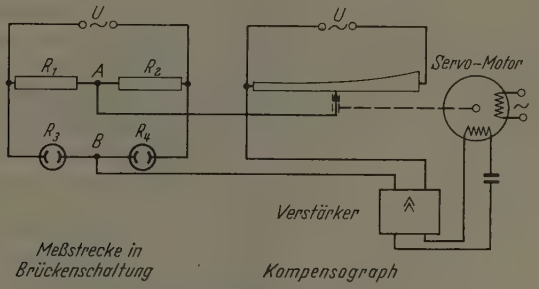


Abb. 5. Prinzipschaltbild zur registrierenden Leitfähigkeitsmessung

ursprünglichen Konzentration der Lauge unabhängig. Die relative Leitfähigkeitsänderung ist die Leitfähigkeitsänderung bezogen auf die Leitfähigkeit der unverbrauchten Natronlauge, die fortwährend in R_3 gemessen wird. Diese Zahl ist für die gleiche Kohlendioxidmenge um so größer, je verdünnter die ursprüngliche Lauge ist.

Abb. 6 zeigt den Zusammenhang zwischen Diagonalspannung U_d und der Leitfähigkeit L_4 für eine 0,005 n Natronlauge. Für L_3 wurde die Leitfähigkeit einer 0,005 n Natronlauge, $L_3 = 1/60 \cdot 10^3 = 16{,}7 \cdot 10^{-6}$ eingesetzt. Für U wurde eine Spannung von 40 V angenommen.

Auch diese Funktion ist nicht linear. Sofern das Kompensationspotentiometer in einer einfachen Schaltung nach Abb. 5 einen linearen Spannungsabfall zeigt, sind die erhaltenen Schreiberausschläge der relativen Leitfähigkeitsänderung nicht geradlinig proportional. Durch zusätzliche Schaltelemente im Kompensationskreis, auf die einzugehen den Rahmen dieser Ausführungen sprengen würde, und die in Abb. 5 durch eine ungleiche Teilung des Kompensationspotentiometers symbolisiert wurden, läßt sich jedoch eine Spannungsverteilung über das gesamte Schreiberpotentiometer erreichen, die in mathematisch genauer Weise der Funktion (2) entspricht. Die mit dieser Anordnung erhaltenen Schreiberausschläge sind also der relativen Leitfähigkeitsänderung direkt proportional und, unter Voraussetzung einer linearen Leitwertkurve (Abb. 1) auch dem Kohlendioxidgehalt. Geringfügige, stetige Abweichungen von der Linearität der Leitwertkurve lassen

sich ebenfalls auf elektrischem Wege begradigen. Ferner ist innerhalb eines größeren Bereiches eine stufenweise Veränderung der Anzeigeempfindlichkeit (etwa im Verhältnis 1:4) sowie innerhalb eines kleineren Bereiches jeweils eine stufenlose Empfindlichkeitsänderung möglich. Diese Anordnung gestattet es, eine Leitfähigkeitsänderung von 10% mit einer relativen Genauigkeit von etwa 0,5% auf 200 mm Schreibstreifenpapier zu registrieren.

Die Benutzung einer Vergleichselektrode R_3 an Stelle eines Festwiderstandes hat eine zweifache Bedeutung. Da sowohl R_3 als auch R_4 aus dem gleichen Laugenvorratsbehälter gespeist werden, folgt die Vergleichselektrode allen bewußt oder unbewußt hervorgerufenen Konzentrationsänderungen der Lauge in idealer Weise. Weil lediglich die relative Leitfähigkeitsänderung gemessen wird, hat man in der Konzentrationsänderung der Lauge ein zusätzliches Mittel, die Größe der Diagonalspannung und damit die Empfindlichkeit des Verfahrens zu variieren und dem jeweiligen Verwendungszweck anzupassen.

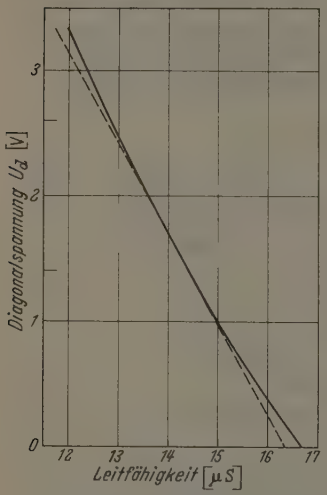


Abb. 6. Abhängigkeit der Diagonalspannung von der Leitfähigkeit. Die gestrichelte Gerade wurde zur Verdeutlichung des nichtlinearen Verlaufs angelegt

Die Hauptbedeutung der Vergleichselektrode liegt jedoch in der Ausschaltung des Temperatureinflusses. Bekanntlich zeigen Elektrolyte eine Leitfähigkeitsänderung von 2%/°C. Bei einer Meßgenauigkeitsforderung von 1% an eine Leitfähigkeitsänderung von 5% wäre eine Temperaturkonstanz von $\pm$ 0,02°C erforderlich. Die Einhaltung dieser Forderung würde einen erheblichen apparativen Aufwand bedingen. Mit Hilfe der Vergleichselektrode R_3 gelingt jedoch eine Ausschaltung des Temperatureinflusses auf einfachste Weise. Beide Elektroden befinden sich in einem gemeinsamen Ölbad, das durch ständige Umwälzung auf homogener, nicht jedoch streng konstanter Temperatur gehalten wird. Temperaturschwankungen gelten nun für beide Elektroden in gleicher Weise. In Gl. (2) wird der Ausdruck

$$\frac{L_4}{L_3} \text{ zu } \frac{L_4(\alpha \Delta t)}{L_3(\alpha \Delta t)} \qquad \alpha = \text{Temperaturkoeffizient}$$
$$\Delta t = \text{Temperaturänderung.}$$

Die zahlenmäßige Größe dieses Ausdrucks und damit die Diagonalspannung bleiben also konstant und sind temperaturunabhängig. Der

auf diese Weise erreichte Temperaturausgleich ist einfacher und universeller als der mit den zuweilen vorgeschlagenen „Temperaturfühlern", da die schwierige und nie ganz zufriedenstellende Anpassung des Temperaturkoeffizienten des Temperaturfühlers an den der Lösung erspart wird.

Die hier für die Messung des Kohlendioxids angestellten Überlegungen gelten selbstverständlich in entsprechender Weise auch für andere Gase, die sich absorbieren lassen und die eine Leitfähigkeitsänderung hervorrufen.

Zusammenfassung

Es wird das Meßprinzip zur relativkonduktometrischen Kohlenstoffbestimmung an Hand einfacher Überlegungen und Schaltskizzen erläutert.

Literatur

[1] Malissa, H.: Mikrochim. Acta (Wien) **1957**, 553; vgl. diese Z. **160**, 287 (1958). — [2] Malissa, H.: Mikrochim. Acta (Wien) **1960**, 127; vgl. diese Z. **178**, 53 (1960). — [3] Malissa, H.: Proceedings of the International Symposium on Microchemistry, Birmingham, 1958; Pergamon Press, London, 1959, S. 97. — [4] Stuck, W.: Mikrochim. Acta (Wien) **1960**, 421.

W. Schmidts, W. Bartscher,
Entwicklungslabor der Firma Heinrich Wösthoff o.H.G., Bochum

Untersuchungslaboratorium der Chemischen Werke Hüls AG,
Marl, Krs. Recklinghausen

Ein Mikroschnellverbrennungsautomat zur Bestimmung von Kohlenstoff und Wasserstoff in organischen Stoffen

Von
Franz Salzer

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 20. August 1960)

In einem Industrielaboratorium werden für Serienanalysen häufig Arbeitskräfte eingesetzt, die keine chemischen Vorkenntnisse besitzen. Dies bedingt einfach gehaltene Arbeitsvorschriften mit möglichst wenig individuellem Spielraum. Die mikroanalytischen Bestimmungsmethoden zur Bestimmung von Kohlenstoff und Wasserstoff, basierend auf den Arbeiten von Pregl, erfüllen diese Forderungen nicht. Diese Methoden setzen ein Personal mit gutem Einfühlungsvermögen und guter Beobachtungsgabe voraus, das häufig schwer und nur nach langer Einarbeitungszeit zu bekommen ist.

Bei der Suche nach einer einfacheren und schnelleren Arbeitsweise wandten wir uns zunächst der von Belcher u. Ingram[1,2,4,5] entwickelten „Rapid Combustion Method" zu. Für eine Bestimmung werden dabei einschließlich Wägung 35—40 min benötigt. Da eine Verbrennungskammer mit eingeschmolzenen Prallplatten und einem Volumen von etwa 110 cm^3 angewandt wird, kann bei einer Sauerstoffgeschwindigkeit von 50 ml/min auf die Anwendung eines Verbrennungskatalysators ganz verzichtet werden. Die Verdampfung der Substanz erfolgt mit einem manuell bewegten Brenner. Als Absorptionsmittel für Stickoxyde wird Mangandioxyd verwandt.

Robertson, Jett u. Dorfman[7] verringerten den Zeitaufwand einschließlich Wägung auf etwa 20 min. Diese beträchtliche Verkürzung liegt zum größten Teil in der Beschleunigung der Wägung. Die Verfasser verwenden Wägeröhrchen vom Pregl-Typ, jedoch mit wesentlich weiteren Capillaren, die in ihrer Länge und Weite genau festgelegt und auf das Temperaturgefälle zwischen Verbrennungsraum und Wägezimmer abgestimmt sind. Voraussetzung ist hierbei, daß die Temperatur des Verbrennungsraumes höher ist als die des Wägezimmers, und daß beide Temperaturen konstant gehalten werden.

Bringt man die Absorptionsröhrchen für Wasser und Kohlendioxyd von der höheren Temperatur in der Nähe der Verbrennungsapparatur auf die niedrigere Temperatur der Waage, so werden sie durch die Abkühlung schwerer. Da sie nach dem Abnehmen von der Apparatur mit Sauerstoff gefüllt sind und dieser im beiderseitig offenen Röhrchen allmählich gegen Luft ausgetauscht wird, müssen die Röhrchen andererseits leichter werden. Bei geeigneten, empirisch ermittelten Capillardimensionen kann die durch Abkühlung bedingte Gewichtszunahme durch die durch Diffusion erreichte Gewichtsabnahme kompensiert werden. Die Röhrchen werden bereits nach wenigen Minuten gewichtskonstant, können also wesentlich früher gewogen werden als dies bisher möglich war. Die Röhrchen werden nicht gewischt und dürfen nur an den Enden mit Lederläppchen oder einer Zange angefaßt werden.

Ein weiterer Vorteil liegt bei dieser Methode in der Brennerführung und der Verbrennung bzw. Pyrolyse der Substanz in einer Quarz- oder Platinkapsel, wie sie erst von Friedrich[3] vorgeschlagen und später auch von Kirsten[6] in abgewandelter Form angewandt wurde. Das Schiffchen mit der Substanzeinwaage wird in eine einseitig offene Quarzkapsel eingeschoben und diese mit dem offenen Ende zum stationären Verbrennungsofen in das Verbrennungsrohr eingeführt. Der Laufbrenner wird vom stationären Ofen her entgegen dem Gasstrom manuell über die Kapsel geführt. Dort läßt man ihn einige Minuten stehen und führt ihn dann wieder zum Verbrennungsofen zurück. Der Rücklauf erfolgt durch Motorantrieb.

Robertson u. Mitarb. benutzen eine modifizierte Hösli-Apparatur, deren eigentlicher Verbrennungsraum nur etwa 16 cm^3 faßt. Er erscheint uns bei einer Gasgeschwindigkeit von 50 ml/min als sehr klein. Dagegen besitzt die Verbrennungskammer von Belcher u. Ingram das 7fache Volumen; die Verweilzeit ist damit wesentlich größer. Außerdem wird durch die eingeschmolzenen Prallplatten in der Verbrennungskammer zusätzlich für eine gute Vermischung der Verbrennungsgase mit dem Sauerstoff gesorgt.

Bei der im folgenden beschriebenen Apparatur benutzten wir das Verbrennungsrohr von Belcher u. Ingram, sowie deren Anordnung für die stationären Öfen, während wir uns in der Verbrennungstechnik und der Wägung der Absorptionsröhrchen an die Methode von Robertson u. Mitarb. hielten. Darüber hinaus wurde in den Apparat ein Programmregler für den Kurzbrenner eingebaut. Nach einem festgelegten Programm läuft der Brenner zunächst vom Hauptofen weg über die Quarzkapsel, bleibt dort stehen und läuft dann selbsttätig in die Ausgangsstellung zurück.

Der Verbrennungsvorgang läuft also ohne jede individuelle Beeinflussung ab. Jede Substanz, ob fest, flüssig, leicht- oder schwerflüchtig, wird nach ein und demselben Programm verbrannt.

Sämtliche Glas- und Quarzverbindungen sind mit Schliffen — vorwiegend Kugelschliffen — hergestellt. Auch die Absorptionsröhrchen sind mit dem Verbrennungsrohr bzw. dem Praterrohr und dem Abschlußrohr durch ungefettete $^1/_4$''-Kugelschliffe verbunden. So entfällt jede Wischtechnik. Das Personal muß lediglich in der Lage sein, Substanzen der verschiedensten Art in Schiffchen und Capillaren auf der Mikrowaage einzuwiegen. Diese Technik ist schnell zu erlernen.

Da eine Verbrennung einschließlich Wägung nur etwa 20 min dauert, entspricht diese Methode den gestellten Forderungen nach einer einfach durchzuführenden, individuell nicht beeinflußten, schnellen C,H-Bestimmung.

1. Beschreibung des C,H-Schnellverbrennungsautomaten *

Der Apparat. Der in Zusammenarbeit mit der Firma Heraeus, Hanau, entwickelte Apparat (Abb. 1—3) besteht aus dem Unterteil, den stationären Öfen (Hauptofen, Neben- und Reinigungsofen), dem beweglichen, aufklappbaren Kurzbrenner, dem Rotamesser und Feinregulierungsquetschhahn, den Wärmeblenden und den Halterungen für die Glas- und Quarzteile.

Das Unterteil trägt auf der Vorderseite alle für den Betrieb erforderlichen Bedienungs- und Anzeigelemente. Eingebaut ist der Transformator

* Komplett, mit allen Glas- und Quarzteilen zu beziehen von Fa. W. C. Heraeus, Abt. Elektrowärme, Hanau.

zur Reduzierung der Wechselspannung von 220 auf 42 Volt, die Schaltgeräte für die Öfen, der Antriebsmechanismus und der Programmregler für den Laufbrenner.

Der als Hauptofen bezeichnete Verbrennungsofen (Abb. 1, *1*) ist unabhängig von den anderen Öfen in ein Gehäuse eingebaut. Der Nebenofen (Silberofen) und der Vorreinigungsofen sind gemeinsam in einem

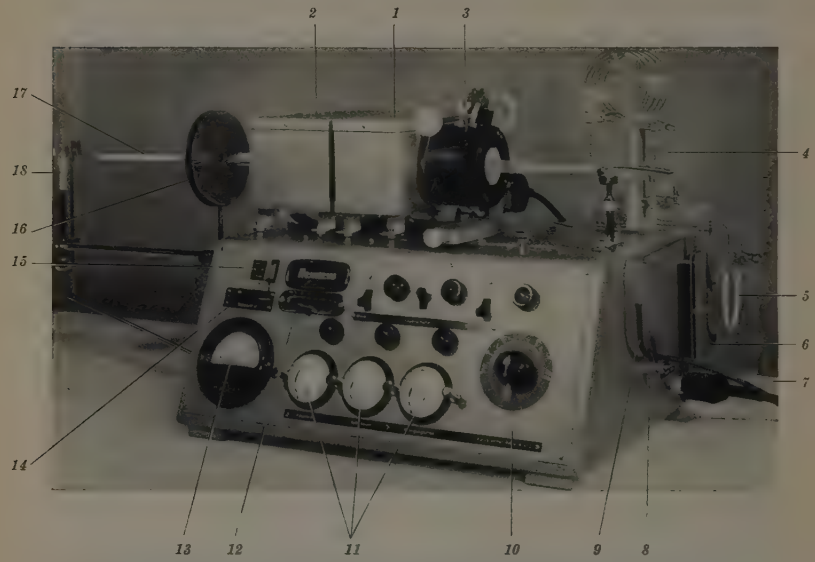


Abb. 1. *Vorderansicht des Verbrennungsautomaten.* *1* Hauptofen (900° C); *2* Reinigungsofen (700 °C) und Nebenofen (500° C); *3* Kurzbrenner; *4* Rotamesser; *5* Kleines Trockenrohr; *6* Wärmeschutzblenden; *7* Stromanschluß (220 V Wechselstrom); *8* Feinregulierungsquetschhahn; *9* Sauerstoffzuführung; *10* Kurzbrennerregulierung; *11* Drehschalter für Haupt-, Neben- und Reinigungsofen; *12* Regler für Laufbrennergeschwindigkeit; *13* Temperaturanzeige für Haupt- und Nebenofen; *14* Meßstellenumschalter; *15* Richtungshebel; *16* Wärmeschutzblende; *17* Absorptionsröhrchen; *18* Praterröhrchen

zweiten Gehäuse untergebracht (Abb. 1, *2*). Eine gemeinsame Unterbringung der 3 Öfen in einem Gehäuse bewährte sich nicht, da sich die auf verschiedene Temperaturen eingestellten Öfen zu stark beeinflußten. Die Öfen sind einzeln mit Drehschaltern (Abb. 1, *11*) stufenlos in weitem Bereich regelbar und temperaturgesteuert. Die Temperaturen des Haupt- und Nebenofens werden thermoelektrisch gemessen und sind am Anzeigegerät (Abb. 1, *13*) wechselweise ablesbar.

Die Haupt- und Nebenofenheizungen bestehen aus Halbschalen, so daß das Verbrennungsrohr bequem ausgewechselt werden kann.

Der Kurzbrenner (Abb. 1, *3*) ist aufklappbar als Freistrahler ausgeführt. Er ist auf einen ausschiebbaren Schlitten montiert. Die Heiztemperatur ist stufenlos in weitem Bereich regelbar (Abb. 1, *10*). Eine von einem Synchronmotor angetriebene Vorschubeinrichtung bewegt ihn mit einer zwischen 13 und 23 mm/min regelbaren Geschwindigkeit (Abb. 1, *12*). Mit Hilfe eines Richtungshebels (Abb. 1, *15*) kann der Kurzbrenner sowohl von rechts nach links als auch umgekehrt ablaufen.

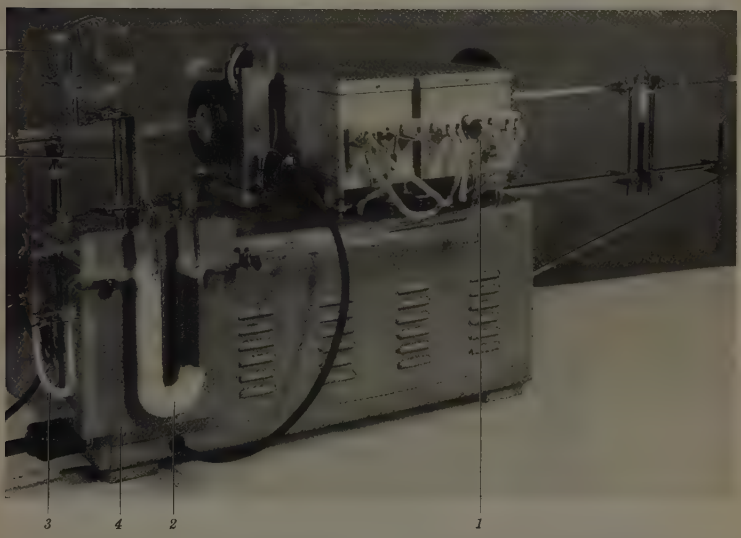


Abb. 2. *Rückansicht des Verbrennungsautomaten.* *1* Vorreinigungsrohr (25%ige platinierte Quarzwolle); *2* großes Trockenrohr; *3* kleines Trockenrohr; *4* Wärmeschutzblenden; *5* Rotamesser; *6* Glasspirale

Mit der Vorschubeinrichtung ist ein Programmregler verbunden. Der Kurzbrenner läuft nach Einschalten des Motors bei der Richtungshebelstellung → zunächst vom Hauptofen weg bis zu einem Anschlag. Es ertönt ein Signal, das an die Umstellung des Richtungshebels nach ← erinnert. Der Brenner selbst bleibt 3 min am Anschlag stehen. Dann läuft er selbsttätig in 4 min zum Hauptofen zurück und bleibt dort stehen. Nach weiteren 4 min ertönt ein zweites Signal. Es zeigt das Ende der Verbrennung an.

Die Vorreinigung. Der Druckflaschen entnommene Sauerstoff strömt über ein Druckminderventil und einen Feinregulierungsquetschhahn (Abb. 1, *8*) zu dem auf 700° C beheizten und mit 25%iger platinierter Quarzwolle gefüllten Reinigungsrohr (Abb. 2, *1*). Zwischen Druckminder-

ventil und Feinregulierungsquetschhahn ist mittels T-Stück ein Druckregler angeschlossen. Vom Vorreinigungsrohr strömt der Sauerstoff durch ein hinter dem Unterteil des Apparates angebrachtes großes Trockenrohr

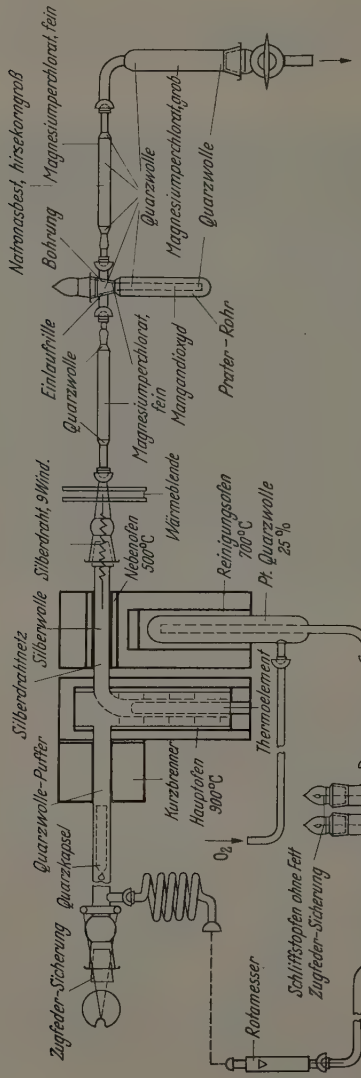


Abb. 3. Apparatur zur Bestimmung von C und H

(Abb. 2, 2), ein zweites kleines U-förmiges Trockenrohr (Abb. 2, 3) zu dem Rotamesser (Abb. 2, 5) und von dort über eine Glasspirale (Abb. 2, 6) zum

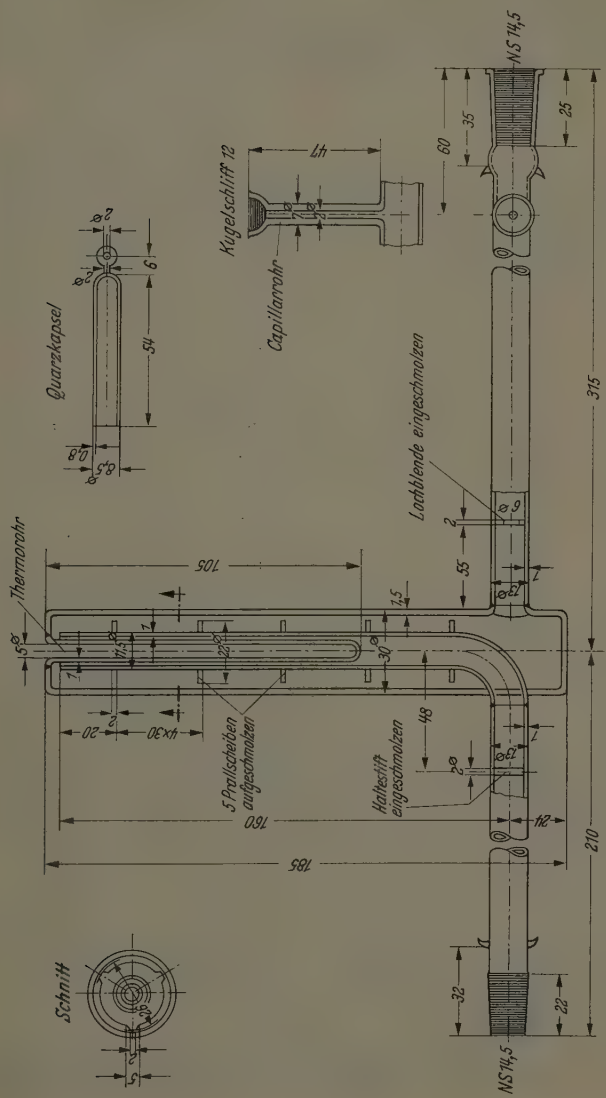


Abb. 4. Verbrennungsrohr und Quarzkapsel für die C- und H-Schnellmethode

Verbrennungsrohr. Durch die Glasspirale wird das Zuleitungsrohr etwas beweglich.

Sämtliche Verbindungen hinter dem Reinigungsrohr sind mit Kugel- bzw. Kegelschliffen hergestellt. Der ebenfalls mit Kugelschliffen eingebaute Rotamesser, dessen Halterung auf dem Unterteil etwas verschoben werden kann, besitzt 2 Meßbereiche von 3—6, bzw. 30—60 ml/min.

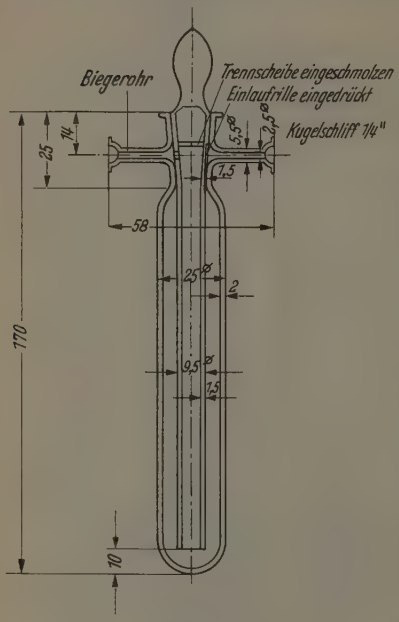


Abb. 5. Praterrohr

Um eine Aufheizung der Trockenrohre zu vermeiden sind diese durch doppelte, zwischen Apparat und U-Rohren eingeschobene Wärmeblenden (Abb. 2, *4*) geschützt. Eine weitere derartige Wärmeschutzblende ist auch zwischen dem Verbrennungsrohrausgang und dem Wasserabsorptionsröhrchen angebracht (Abb. 1, *16*).

Das Verbrennungsrohr und die Quarzkapsel (Abb. 4). Das Verbrennungsrohr entspricht weitgehend dem von BELCHER u. INGRAM vorgeschlagenen. Zur Temperaturmessung wurde in den Kammerteil ein Thermoelementschutzrohr eingeschmolzen. Im geraden Rohrstück vor der Kammer ist eine Lochblende zur Halterung der Quarzwolle und im Ausgangsteil ein Quarzstift zur Halterung der Silberdrahtnetzrolle eingeschmolzen. Die Abmessungen der Quarzkapsel sind so gewählt, daß in diese ein Platinblech ($50 \times 10 \times 0{,}1$ mm) und Platinschiffchen mit den Größen $15 \times 4 \times 4$ und $35 \times 5 \times 4$ mm bequem eingeschoben werden können. Das Platinblech sorgt für eine bessere Wärmeleitung.

Das Praterrohr (Abb. 5). Das zur Absorption der Stickoxyde zwischen Wasser- und CO_2-Absorptionsrohr eingesetzte Praterrohr, dessen Abmessungen aus Abb. 5 zu entnehmen sind, ist an beiden Enden mit Kugelschliffschalen $^1/_4$" ausgerüstet. Wesentlich ist die zur Verhinderung des toten Raumes im Stopfen dicht oberhalb der Bohrung eingeschmolzene Trennscheibe.

Die Absorptionsröhrchen (Abb. 6). In den Abmessungen entsprechen sie den von ROBERTSON u. Mitarb. gemachten Angaben. Sie sind jedoch

an den Enden mit Kugelschliffköpfen ($^1/_4$'') versehen. Die Capillarlänge beträgt bei einem Temperaturgefälle von 2,0 bzw. 1,5° C zwischen H_2O- bzw. CO_2-Absorptionsröhrchen an der Apparatur und an der Waage etwa 4 mm, der Capillardurchmesser 0,6—0,7 mm. Wesentlich ist, daß die Wülste hinter den Kugelschliffköpfen so lang sind, daß sich die Spannkraft der Halteklammern genügend auswirken kann.

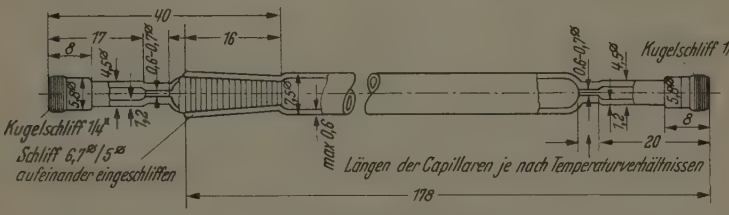


Abb. 6. Absorptionsrohr für CO_2 und H_2O

Das Magnesiumperchloratschutzrohr (Abb. 3). Am Ausgang des CO_2-Absorptionsröhrchens ist als Abschluß gegen die Raumluft noch mittels Kugelschliff ein Magnesiumperchloratschutzrohr angeschlossen.

Die Waage. Als Waage wird die Mettler-Mikrowaage, Typ M-5, verwandt.

2. Die Vorbereitung der Apparatur

Alle Glasteile werden mit heißer Chromschwefelsäure und Wasser gespült und im Trockenschrank getrocknet. Das *Verbrennungsrohr* wird an einem Ende mit einem paraffinierten Gummistopfen verschlossen und das ganze Rohr mit 40%iger Flußsäure gefüllt. Nach 1stündigem Stehen läßt man die Flußsäure ablaufen und spült das Quarzrohr gründlich mit dest. Wasser, Aceton p.a. und Äther p.a. Dann wird gefilterte, trockene Luft durchgesaugt.

Silberdrahtnetz, 525 Maschen/cm² und Silberwolle, fein gelockt, 0,04—0,06 m (Heraeus) werden mit Äther p.a. entfettet und in staubfreier Luft getrocknet.

In den Eingangsteil des Verbrennungsrohres wird ein 40 mm langer Quarzwollestopfen an die Lochscheibe angedrückt. In den Ausgangsteil des Quarzrohres wird ein 10 mm langes, eng gepacktes Silberdrahtnetzröllchen bis an den Haltestift herangeschoben. Dann folgt eine 90 mm lange Silberwollepackung. In das Ende dieser Packung wird eine 1 mm starke Silberspirale mit etwa 9 Windungen zur Wärmeleitung eingeschoben. Das gerade Stück des Silberdrahtes reicht über das Quarzrohrende hinaus in das konische Aufsatzstück hinein und endet ca. 20 mm vor dessen Schliffende.

Das *Vorreinigungsrohr* wird mit 25%iger platinierter Quarzwolle gefüllt und nach der Befüllung zugeschmolzen.

Das *große U-Rohr* in der Vorreinigung wird vom Gaseingang her folgendermaßen gefüllt: 10 mm Quarzwolle; 70 mm Natronasbest, feinkörnig (Merck Nr. 1564); 15 mm Quarzwolle; 70 mm Magnesiumperchlorat, Körnung 1,5—3 mm; 10 mm Quarzwolle; 70 mm Magnesiumperchlorat, Körnung 0,5—1 mm; 10 mm Quarzwolle. Die Rohrfüllung wird jeweils nach 4 Wochen erneuert.

Das *kleine U-Rohr*, dessen Füllvolumen etwa dem des Absorptionsröhrchens entspricht, wird zusammen mit den Absorptionsröhrchen mit demselben Magnesiumperchlorat, Körnung 0,5—1 mm, täglich neu gefüllt. Der maximale Wassergehalt dieses Magnesiumperchlorats soll 13% nicht übersteigen. Ein Perchlorat mit höherem Wassergehalt wird zur Trocknung im Ölpumpenvakuum auf 150° C erhitzt. Bei einem Wassergehalt von etwa 16% genügt eine Trocknungszeit von 2 Std. Trocknet man zu stark, so wird das Material pulvrig.

Die *Absorptionsröhrchen* werden täglich vor Arbeitsschluß folgendermaßen gefüllt:

H_2O-Absorptionsröhrchen. 5 mm Quarzwolle; 120 mm Magnesiumperchlorat, Körnung 0,5—1 mm (Wassergehalt maximal 13%); 5 mm Quarzwolle.

CO_2-Absorptionsröhrchen. 5 mm Quarzwolle; 30 mm Magnesiumperchlorat, 0,5—1 mm; 5 mm Quarzwolle; 85 mm Natronasbest, hirsekorngroß (Merck Nr. 1567); 5 mm Quarzwolle). Die Schliffe der Röhrchen werden nach der Befüllung sorgfältig ausgewischt und mit Krönigschem Glaskitt eingesetzt. Der überschüssige Kitt in den Schliffkanten wird mit einem benzolfeuchten Wattebausch sorgfältig entfernt. Die Röhrchen werden nur einmal täglich, zum Arbeitsbeginn, mit feuchten Leinenläppchen und mit Rehlederläppchen gereinigt.

Das an den Stopfen des *Praterrohres* angeschmolzene Rohrstück enthält als Füllung: 10 mm Quarzwolle; 25 mm Magnesiumperchlorat, 0,5—1 mm; 5 mm Quarzwolle; 95 mm Mangandioxyd (HOPKIN u. WILLIAMS, London); 5 mm Quarzwolle. Der Stopfen wird mit Exsiccatorfett sorgfältig gefettet und in die Hülse eingesetzt. Die Füllung wird wöchentlich erneuert.

Das *Abschlußröhrchen* hinter dem CO_2-Absorptionsröhrchen wird mit Magnesiumperchlorat, Körnung 1,5—3 mm, gefüllt. Als Abschluß wird Quarzwolle benutzt.

In den für die *Sauerstoffzuleitung* zum Apparat benutzten, künstlich gealterten Schlauch wird an der Stelle, die mit dem Feinregulierungsquetschhahn abgedrückt wird, ein Asbestfaden eingelegt.

Der Zusammenbau der gesamten Apparatur geht aus Abb. 3 hervor.

3. Die Durchführung der Bestimmung

Zum Arbeitsbeginn werden die Ofentemperaturen geprüft. Diese betragen für den Hauptofen 900° C, den Nebenofen 500° C und den Vorreinigungsofen 700° C.

Nun wird das frisch gefüllte Nachtrocknungsrohr eingesetzt und die Gasgeschwindigkeit auf 50 ml/min einreguliert. Die Absorptionsröhrchen werden mit einem trockenen Lederläppchen leicht abgewischt und angeschlossen.

In ein Platinschiffchen wird eine ungewogene Menge einer Testsubstanz eingefüllt (etwa 4 mg) und das Schiffchen soweit als möglich in die Quarzkapsel eingeschoben. Das Verbrennungsrohr wird geöffnet, die Quarzkapsel mit der offenen Seite zum Hauptofen, bis auf 7 cm an diesen heran, eingeschoben. Das Verbrennungsrohr wird mit dem Schliffstopfen verschlossen und dieser mit einer Feder angedrückt. Der Hahn des Praterrohres wird geöffnet und der Hahn am Abschlußrohr geschlossen. Man prüft auf Dichtigkeit. Beide Schwimmer des Rotamessers müssen in der Ruhelage bleiben.

Ist die Apparatur dicht, so wird der Hahn am Abschlußrohr geöffnet, die Gasgeschwindigkeit (50 ml/min) nochmals kontrolliert und der auf etwa 500° C vorgeheizte Kurzbrenner direkt am Hauptofen über das Verbrennungsrohr geschoben und zugeklappt. Die Heizung des Kurzbrenners wird auf 900° C eingestellt, der Richtungshebel (Abb. 1, *15*) in die Stellung → gebracht und der Geschwindigkeitshebel (Abb. 1, *12*) auf 15 mm/min eingestellt. Der Antriebsmotor wird eingeschaltet. Der Brenner läuft in etwa 4 min bis zum Anschlag. In der Endstellung bedeckt er

die Quarzkapsel vollständig. Bei Erreichen des Anschlags ertönt ein Signal, das an die Umstellung des Richtungshebels nach ← erinnert. Der Brenner bleibt nach Ertönen des Signals noch 3 min in dieser Stellung stehen. Dann setzt automatisch der Rücklauf ein, wofür wiederum 4 min benötigt werden. Weitere 4 min nach Erreichen des Hauptofens wird ein zweites Signal ausgelöst. Die Verbrennung ist beendet. Der Richtungshebel wird nach → umgelegt, der Motor abgeschaltet und die Verbindung zwischen Verbrennungsrohrausgang und Wasserabsorptionsröhrchen gelöst. Das Praterröhrchen wird durch Drehen des Stopfens verschlossen, der Kurzbrenner wird aufgeklappt, nach hinten weggeschoben, wieder zugeklappt und die Ofentemperatur auf 500° C zurückgestellt.

Nun faßt man das Wasserröhrchen am Capillarende mit einem Lederläppchen vorsichtig an, löst die Klammer zwischen Praterrohr und Wasserröhrchen und legt das Röhrchen auf eine Glasbank ab. Dann wird die Klammer zwischen Praterrohr und CO_2-Röhrchen gelöst, das Röhrchen mit einem Lederläppchen an der Capillare angefaßt und die letzte Klammer zwischen CO_2-Röhrchen und Abschlußrohr entfernt. Eine Stoppuhr wird eingeschaltet. Die beiden Röhrchen werden an den Enden mit dem Lederläppchen gefaßt und zur Waage gebracht und dort abgelegt.

Nachdem der O-Punkt der Waage kontrolliert ist, wird zunächst das CO_2-Röhrchen mit einer langen Zange auf die Waage gelegt. 3 min nach Abnahme von der Verbrennungsapparatur wird das Gewicht des CO_2-Röhrchens abgelesen, das Röhrchen aus der Waage herausgenommen und das Wasserröhrchen eingesetzt. Dessen Gewicht wird nach weiteren 2 min, also 5 min nach Abnahme von der Apparatur abgelesen.

Hiermit ist die Einlaufverbrennung beendet und das Grundgewicht der Röhrchen festgestellt.

Die Zeit zwischen dem ersten und zweiten Signal — insgesamt 11 min — benutzt man zur Substanzeinwaage (3,8—4,2 mg).

Die gewogenen Absorptionsröhrchen werden zur Apparatur zurückgebracht und erst das CO_2-Röhrchen an das Abschlußröhrchen, dann an das Praterrohr angeschlossen. Das Wasserröhrchen wird an das Praterrohr und das Verbrennungsrohr angeschlossen, der Hahn des Praterröhrchens geöffnet, der des Abschlußrohres geschlossen und die Apparatur auf Dichtigkeit geprüft.

Man öffnet das Verbrennungsrohr und zieht die Quarzkapsel mit einem Haken aus dem Rohr heraus, ersetzt das Platinschiffchen durch ein zweites, das die neue Einwaage enthält und in der Zwischenzeit im Exsiccator aufbewahrt wurde. Die Quarzkapsel samt Einwaage wird wieder in das Rohr eingeschoben und das Rohr verschlossen. Der Hahn am Abschlußrohr wird geöffnet. Nach der Kontrolle der Gasgeschwindigkeit wird der Kurzbrenner über das Verbrennungsrohr geschoben. Die Heizung wird auf 900° C eingestellt und der Motor eingeschaltet. Im übrigen verfährt man wie oben angegeben.

4. Untersuchungsergebnisse

Die Brauchbarkeit der Methode wurde an den in Tab. 1 aufgeführten Testsubstanzen erprobt. Neben festen Stoffen wurden auch flüssige und leicht flüchtige, wie z. B. Äther, Äthylacetat, Aceton, verbrannt. Ferner wurden Produkte mit hohen Chlor- und Stickstoffgehalten sowie schwefelhaltige Stoffe analysiert. Bei einer Temperatur des Wägeraumes von 23,5—24,5° C betrugen die Temperaturgefälle Apparatur/Waage für das Wasserröhrchen 2,5° C, für das CO_2-Röhrchen 2,0° C. Die relative Luftfeuchtigkeit im Wägeraum schwankte zwischen 37 und 43%. Die

Tabelle 1. *Testanalysen*

Produkt	Bruttoformel	Theoretische Werte		gefundene ⌀-Werte aus 15 Bestimmungen		Abweichung der ⌀-Werte von den theoretischen Werten		Vergleichsstreubereich σ aus 15 Bestimmungen (5 Analytiker an 5 Apparaturen)	
		% C	% H	% C	% H	C	H	% C	% H
1. Benzoesäure	$C_7H_6O_2$	68,84	4,95	68,84	4,95	0,00	0,00	± 0,08	± 0,08
2. Dimedon	$C_8H_{12}O_2$	68,54	8,63	68,46	8,63	— 0,08	0,00	± 0,12	± 0,11
3. Mannit	$C_6H_{14}O_6$	39,65	7,75	39,63	7,83	— 0,02	+ 0,06	± 0,18	± 0,12
4. Vanillin	$C_8H_8O_3$	63,15	5,30	63,16	5,40	+ 0,01	+ 0,10	± 0,11	± 0,04
5. Palmitinsäure	$C_{16}H_{32}O_2$	74,94	12,58	74,89	12,65	— 0,05	+ 0,07	± 0,10	± 0,05
6. Butinalacetal	$C_6H_{10}O_2$	63,13	8,83	63,19	8,80	+ 0,06	— 0,03	± 0,13	± 0,05
7. Diäthyläther	$C_4H_{10}O$	64,81	13,60	64,69	13,69	— 0,12	+ 0,09	± 0,19	± 0,07
8. Essigsäureäthylester	$C_4H_8O_2$	54,53	9,15	54,42	9,20	— 0,11	+ 0,05	± 0,18	± 0,12
9. Aceton, wasserfrei	C_3H_6O	62,04	10,41	61,90	10,52	— 0,14	+ 0,11	± 0,10	± 0,04
10. Benzol	C_6H_6	92,26	7,74	91,96	7,93	— 0,30	+ 0,19	± 0,14	± 0,08
11. Phenacetin	$C_{10}H_{13}O_2N$	67,01	7,31	67,05	7,40	+ 0,04	+ 0,09	± 0,12	± 0,05
12. Aminobenzoesäure	$C_7H_7O_2N$	61,31	5,15	61,29	5,26	— 0,02	+ 0,11	± 0,14	± 0,06
13. Diphenylamin	$C_{12}H_{11}N$	85,17	6,55	85,17	6,61	0,00	+ 0,06	± 0,14	± 0,06
14. Azobenzol	$C_{12}H_{10}N_2$	79,10	5,64	79,04	5,64	— 0,06	0,00	± 0,10	± 0,08
15. Dimethylglyoxim	$C_4H_8O_2N_2$	41,40	6,95	41,50	7,09	+ 0,10	+ 0,14	± 0,12	± 0,04
16. Hexamethylentetramin	$C_6H_{12}N_4$	51,40	8,62	51,45	8,73	+ 0,05	+ 0,11	± 0,11	± 0,08
17. 3,5-Dinitrobenzoesäure	$C_7H_4O_6N_2$	39,63	1,90	39,70	2,03	+ 0,07	+ 0,13	± 0,11	± 0,07
18. Pikrinsäure	$C_6H_3O_7N_3$	31,45	1,32	31,49	1,49	+ 0,04	+ 0,17	± 0,12	± 0,05

19. Tetrachlordioxan	$C_4H_4O_2Cl_4$	21,27	1,78	21,40	1,92	+ 0,13	+ 0,14	± 0,10	± 0,06
20. Heptachlordioxan	$C_4HO_2Cl_7$	14,59	0,31	14,67	0,43	+ 0,08	+ 0,12	± 0,09	± 0,08
21. 2,6-Dichlor-4-hexylphenol	$C_{12}H_{16}OCl_2$	58,30	6,53	58,28	6,56	— 0,02	+ 0,03	± 0,18	± 0,08
22. 3-Chlor-6-benzoylphenol	$C_{13}H_9O_2Cl$	67,11	3,90	66,99	3,99	— 0,12	+ 0,09	± 0,13	± 0,05
23. Trichlorphenylbenzyläther	$C_{13}H_9OCl_3$	54,27	3,15	54,18	3,30	— 0,12	+ 0,15	± 0,14	± 0,11
24. Polyvinylchlorid	$(C_2H_3Cl)_x$	38,45	4,80	38,47	4,97	+ 0,02	+ 0,17	± 0,13	± 0,09
25. Diäthylbromid-hexahydrobenzcatechin	$C_8H_{14}O_2Br_2$	31,81	4,67	31,92	4,76	+ 0,11	+ 0,09	± 0,13	± 0,07
26. 2,4-Dichlor-6-nitrophenol	$C_6H_3O_3NCl_2$	34,64	1,45	34,77	1,56	+ 0,13	+ 0,11	± 0,10	± 0,07
27. Sulfanilsäure	$C_6H_7O_3NS$	41,61	4,06	41,60	4,19	— 0,01	+ 0,13	± 0,12	± 0,08
28. Toluolsulfochlorid	$C_7H_7O_2ClS$	44,11	3,70	44,05	3,83	— 0,06	+ 0,13	± 0,10	± 0,05
Mittelwerte:						— 0,02	+ 0,09	± 0,13	± 0,07

Absorptionsröhrchen waren mit 4 mm langen und 0,6 mm weiten Capillaren ausgerüstet. Alle Substanzen, auch die niedrigsiedenden, wurden von 5 angelernten Arbeitskräften an 5 Apparaturen nach ein und demselben Programm je 3mal verbrannt. Aus den erhaltenen 15 Wertepaaren wurden die Mittelwerte, deren Abweichung von den theoretischen Werten und die Vergleichsstreubereiche σ berechnet. Wie die Zahlenwerte in Tab. 1 zeigen, weichen die gefundenen durchschnittlichen C-Werte kaum von den theoretischen C-Werten ab (— 0,02%). Dagegen liegen die durchschnittlichen H-Werte im Mittel 0,09% höher als die theoretischen H-Werte. Die Vergleichsstreubereiche σ betragen im Mittel bei der C-Bestimmung ± 0,13%, bei der H-Bestimmung ± 0,07%.

Substanzen mit hohen Chlor-, Stickstoff- oder Schwefelgehalten, ebenso niedrig siedende Produkte bereiten keine Schwierigkeiten. Auch hoch explosive Substanzen, wie z. B. Pikrinsäure oder Butinalacetal lassen sich ohne weitere Vorsichtsmaßnahmen sicher verbrennen. Die letztere Substanz versuchten wir schon mehrfach in einer modifizierten Pregl-Apparatur zu verbrennen. Dabei kam es immer zu Explosionen, die meist so heftig waren, daß das Verbrennungsrohr zerstört wurde.

Seit einem halben Jahr sind 5 derartige Apparate für die

laufende Untersuchung eingesetzt. Die Schwierigkeiten des Anlernens neuer Arbeitskräfte sind behoben. Während früher 10—12 Pregl-Apparaturen zur Bewältigung unseres Arbeitsanfalls erforderlich waren, erledigen wir heute mit 5 neuen Apparaten ein größeres Arbeitsvolumen als früher. Außerdem ist die Zuverlässigkeit der Einzelwerte verbessert worden.

Bemerkungen zur Apparatur

Wärmeschutz. Wie oben bereits ausgeführt, sind die beiden Trockenröhren der Vorreinigung hinter, bzw. neben dem Unterteil des Apparates, und von diesem durch Wärmeblenden geschützt, angeordnet. Diese Maßnahme ist erforderlich, da diese Trockenröhren sonst durch die Öfen und den Transformator stärker erwärmt werden als die Absorptionsröhrchen. Dies führt zu erhöhten C- und H-Werten, zumal dann, wenn ein handelsübliches Magnesiumperchlorat mit einem Wassergehalt von 17—18% angewandt wird. Neuerdings verwenden wir ein Magnesiumperchlorat mit einem Wassergehalt von etwa 10%.

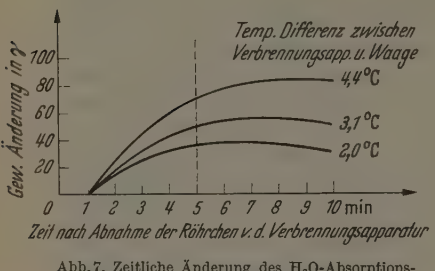


Abb. 7. Zeitliche Änderung des H_2O-Absorptionsröhrchengewichtes in Abhängigkeit von der Temperaturdifferenz zwischen Verbrennungsapparatur und Mikrowaage. Luftfeuchtigkeit ~ 40%

Die Absorptionsröhrchen. Die Capillarweiten der Absorptionsröhrchen richten sich, wie bereits von ROBERTSON u. Mitarb. angegeben, nach dem Temperaturgefälle zwischen Apparatur und Waage. Ist dieses größer, so muß die Gewichtsänderung durch Diffusion vergrößert werden, um die durch die größere Abkühlung bedingte höhere Gewichtsänderung zu kompensieren. In Abb. 7 sind einige Gewichtsänderungskurven für verschiedene Temperaturgefälle aufgezeichnet. Hierzu wurden Röhrchen mit 0,6 mm Capillarweite verwandt. Es wurden jeweils 16 Leerverbrennungen durchgeführt und die Röhrchen 1, 2, 3 min nach Abnahme von der Apparatur gewogen. Aus den 16 Bestimmungen wurden die mittleren Gewichtsänderungen berechnet. Wie Abb. 7 zeigt, ändert sich das Gewicht der Wasserröhrchen bei einem Temperaturgefälle von 2,0° C zwischen 5 und 8 min nach Abnahme vom Verbrennungsapparat nur noch wenig. Bei höherem Temperaturgefälle, z. B. 3,1° C verschiebt sich der Bereich der kleinsten Gewichtsänderung auf 6—9 min, bei 4,4° C auf 7—10 min.

Es empfiehlt sich also, das Temperaturgefälle möglichst klein zu halten, wenn man nicht weitere Capillaren verwenden will. Wir arbeiten nunmehr mit einem Temperaturgefälle von 1,5° C für das CO_2-Röhrchen bzw. 2,0° C für das H_2O-Röhrchen. Eine weitere Verringerung des Tem-

peraturgefälles ist wärmetechnisch schwer durchführbar, wenn Verbrennungsraum und Wägezimmer mit nur einer Anlage klimatisiert werden.

Der Einfluß der Capillarweite ist aus Tab. 2 ersichtlich. Wie in Abb. 7 dargestellt, wurden die Gewichtsänderungskurven aus jeweils 16 Leerverbrennungen für Röhrchen mit verschieden weiten Capillaren bestimmt.

Tabelle 2. *Zeitliche Änderung des Gewichtes der Wasserabsorptionsröhrchen in Abhängigkeit vom Capillardurchmesser der Röhrchen*
(Durchmesser-Werte aus je 16 Bestimmungen)

Capillar-durchmesser mm	Capillar-länge mm	Taupunkt im Wägeraum °C	relative Luftfeuchtigkeit %	Temperatur-Gefälle Apparatur-Waage °C	Gewichtsänderung 2 µg/min nach Abnahme von der Apparatur min
0,9	5	+ 10,0	41	2,1	4,2
0,78	5	+ 10,0	40	1,9	4,8
0,70	5	+ 10,4	41	1,8	5,3
0,60	4	+ 10,0	41	2,1	7,2

Aus den einzelnen Kurven wurde der Zeitpunkt, bei dem jeweils die Gewichtsänderung 2 µg/min betrug, graphisch ermittelt. Diese Gewichtsänderung ist bei den Röhrchen mit 0,9 mm Capillarweite bereits nach 4,2 min, bei den Röhrchen mit 0,6 mm Capillarweite und 4 mm Länge erst nach 7,2 min erreicht. (Temperaturgefälle etwa 2° C.)

Tabelle 3. *C-H-Bestimmung mit Absorptionsröhrchen mit verschiedenen Capillarweiten*
Testsubstanz: Diphenylamin (85,17% C, 6,55% H); relative Luftfeuchtigkeit: 37%; Temperatur des Wägeraumes: 24° C; Temperaturgefälle Apparat-Waage für CO_2-Röhrchen 1,7° C, für Wasserröhrchen 2,1° C

Capillaren		gefundene Werte		Abweichung der Mittelwerte von den theoretischen Werten	
Durchmesser mm	Länge mm	% C	% H	% C	% H
0,6	4	85,07 ± 0,09[1]	6,63 ± 0,04	—0,10	+0,08
0,78	5	85,16 ± 0,08	6,68 ± 0,03	—0,01	+0,13
0,90	5	85,05 ± 0,24	6,69 ± 0,05	—0,12	+0,14

[1] Durchschnittswerte aus jeweils 9 Bestimmungen.

Aus diesen Versuchen müßte man schließen, daß die von uns gewählten Capillarwerte zu klein sind und auf 0,7—0,8 mm bei 5 mm Capillarlänge erhöht werden müßten. Bei Versuchen stellten wir jedoch fest, daß bei Röhrchen mit sehr weiten Capillaren die C-, H-Werte stärker streuen und daß vor allem die H-Werte höher gefunden werden (Tab. 3). Die stärkere Streuung wurde vor allem bei den C-Werten beobachtet. Diese

stärkere Streuung, aus relativ wenig Einzelwerten errechnet (9 Bestimmungen), dürfte auch für die Herabsetzung des mittleren C-Wertes bei den extrem weiten Röhrchen verantwortlich sein. Die Streuung bei den H-Werten änderte sich nur wenig. Dagegen stiegen die mittleren H-Werte bei den Röhrchen mit weiteren Capillaren deutlich an. Wir vermuten, daß die Feuchtigkeit der Raumluft hierfür verantwortlich ist.

Daß die Luftfeuchtigkeit einen Einfluß ausübt, zeigen die in Tab. 4 mitgeteilten Werte. Während bei 27% rel. Luftfeuchtigkeit die H-Werte bei

Tabelle 4. *Abhängigkeit der C,H-Werte von der Luftfeuchtigkeit (Testsubstanz: Diphenylamin)*

(Absorptionsröhrchen mit Capillar-Durchmesser 0,6 mm und Capillar-Länge 4 mm)

Anzahl der Bestimmungen	Taupunkt im Wägeraum °C	relative Luftfeuchtigkeit in %	Abweichung der Mittelwerte vom theoretischen Wert		berechneter Wiederholstreubereich σ	
			% C	% H	% C	% H
17	3,5— 4,4	~ 27	+ 0,10	+ 0,07	± 0,14	+ 0,04
77	9,1—10,8	~ 40	— 0,05	+ 0,11	± 0,15	± 0,06
20	11,8—12,0	~ 47	— 0,09	+ 0,17	± 0,13	± 0,04

der Verbrennung von Diphenylamin nur um 0,07% abs. über dem theoretischen Wert liegen, beträgt die mittlere Abweichung bei 47% rel. Luftfeuchtigkeit + 0,17%.

Um die Störungen durch die Luftfeuchtigkeit zu verringern, sind wir dazu übergegangen, diese so weit als möglich zu drücken. Wir halten diese nunmehr bei etwa 20—30% (gemessen in Wägeraum). Das Temperaturgefälle wurde auf 2,0° C für das H_2O-Röhrchen und 1,5° C für das CO_2-Röhrchen gesenkt. Als Absorptionsröhrchen verwenden wir weiterhin solche mit einer Capillarlänge von 4—5 mm und einer Capillarweite von 0,6—0,7 mm. Die damit gefundenen H-Werte liegen im Mittel um 0,06% über den theoretischen Werten.

Wie weit diese noch verbliebene Erhöhung durch Einbringen von Feuchtigkeit bei der Substanzeinführung bedingt ist, können wir nicht sagen. Beobachtet wurde jedoch, daß wir bei längerem Gebrauch einer Quarzkapsel höhere H-Werte finden, und zwar umso mehr, je weiter die Entglasung des Quarzes fortgeschritten ist. Offenbar adsorbiert die durch die Entglasung aufgerauhte Quarzkapsel nach dem Herausnehmen aus dem Verbrennungsrohr Wasser, das dann mitbestimmt wird. Die Quarzkapseln werden deshalb gewechselt, wenn die Entglasung sichtbar wird. Im allgemeinen ist ein 3wöchiger Gebrauch möglich, wenn nicht Proben, die Alkalimetallverbindungen enthalten, verbrannt werden.

Die Verwendung von Platinkapseln an Stelle der Quarzkapseln brachte keine Vorteile. Auch hier scheinen die Werte bei längerem Gebrauch der Platinkapsel schlechter zu werden. Hinzu kommt noch, daß

das Verbrennungsrohr über der Platinkapsel schnell blind wird, was wir bei Verwendung von Quarzkapseln nicht beobachten.

Die Schliffverbindungen der Absorptionsröhrchen. Ursprünglich stellten wir die Verbindungen zwischen den Absorptionsröhrchen, dem Praterrohr, dem Verbrennungsrohr und dem Abschlußrohr mit Siliconschlauch her. Dies bewährte sich auch, aber nur für kurze Zeit. Bei längerem Gebrauch bildete sich auf dem Glas ein deutlicher Film, der ein Wischen erforderlich gemacht hätte. Wir sind deshalb zu ungefetteten Kugelschliffverbindungen übergegangen, die sich sehr gut bewähren, wenn ihr einwandfreier Verschluß durch Dichtigkeitsprüfungen festgestellt wird.

Tabelle 5. *Wirkungsdauer einer Mangandioxydfüllung bei der Verbrennung von Sulfanilsäure (C:41,61%, H: 4,06%, N: 8,09%) bzw. Hexamethylentetramin (C: 51,40%, H: 8,62%, N: 39,98%)*

	Gesamtzahl der Verbrennungen mit einer MnO_2-Füllung	Gesamtmenge eingebrachter Stickstoff in mg	gefundener Durchschnittswert		Abweichung des Durchschnittswertes vom theoretischen Wert	
			% C	% H	% C	% H
Sulfanilsäure						
1. Tag	16	5,6	41,73	4,19	+ 0,12	+ 0,13
2. Tag	32	10,8	41,82	4,19	+ 0,21	+ 0,13
3. Tag	48	16,0	41,82	4,20	+ 0,21	+ 0,14
4. Tag	64	21,2	41,78	4,19	+ 0,17	+ 0,13
5. Tag	77	25,6	41,80	4,19	+ 0,19	+ 0,13
Hexamethylentetramin						
1. Tag	12	19,3	51,59	8,76	+ 0,19	+ 0,14
2. Tag	28	45,0	51,63	8,77	+ 0,23	+ 0,15
3. Tag	44	70,8	51,71	8,80	+ 0,31	+ 0,18
4. Tag	57	92,8	51,77	8,77	+ 0,37	+ 0,15
5. Tag	73	117,7	51,96	8,77	+ 0,56	+ 0,15
6. Tag	80	129,0	51,90	8,76	+ 0,50	+ 0,14
7. Tag	96	155,2	52,57	8,88	+ 1,17	+ 0,16

Das Praterrohr. Das zur Absorption der Stickoxyde benutzte Mangandioxyd wird jeweils nach 5 Arbeitstagen ausgewechselt. Diese Zeitdauer ist tragbar, wenn man nicht ausschließlich Substanzen mit hohem Stickstoffgehalt verbrennt. Es wurden an einem noch im Entwicklungsstadium befindlichen Apparat laufend Verbrennungen mit Sulfanilsäure (8,09% N) und außerdem mit Hexamethylentetramin (39,94% H) durchgeführt und von den täglich durchgeführten Bestimmungen die Durchschnittswerte und deren Abweichungen vom theoretischen Wert berechnet. Nach 77 Sulfanilsäureanalysen, bei denen insgesamt 25,6 mg N eingebracht werden, war die Genauigkeit noch unverändert (Tab. 5). Bei der

Verbrennung von Hexamethylentetramin stiegen die C-Werte nach 57 Verbrennungen (92,8 mg N) bereits deutlich an. In einem derartigen Fall muß man die Mangandioxydfüllung häufiger wechseln.

Zusammenfassung

Es wird ein Apparat zur Mikrobestimmung von Kohlenstoff und Wasserstoff beschrieben, bei dem im leeren Rohr verbrannt wird und die Stickoxyde mit Mangandioxyd absorbiert werden. Die Substanz wird in einer Quarzkapsel verbrannt. Der Laufbrenner läuft automatisch vom Verbrennungsofen weg entgegen dem Sauerstoffstrom über die Kapsel, bleibt dort stehen und läuft selbsttätig in die Ausgangsstellung zurück. Das durch einen Regler festgelegte Verbrennungsprogramm ist sowohl für feste, schwer verbrennliche als auch für flüssige, leicht flüchtige Stoffe unverändert anwendbar. Eine subjektive Beeinflussung der Verbrennung ist damit ausgeschaltet.

Für diese Verbrennung einschließlich Wägung werden etwa 20 min benötigt. Die Vergleichsstreubereiche σ betragen für Kohlenstoff: $\pm$ 0,13%, für Wasserstoff: $\pm$ 0,07%.

Bedingung ist, daß die Temperatur des Verbrennungsraumes und des Wägezimmers konstant gehalten wird und letztere unter der des Verbrennungsraumes liegt. Die Luftfeuchtigkeit wird zweckmäßig möglichst niedrig gehalten.

Meinem inzwischen verstorbenen Mitarbeiter, Herrn W. Kamp, danke ich für die rege Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Literatur

[1] Belcher, R.: Fuel **20**, 130 (1941). — [2] Belcher, R., u. G. Ingram: Anal. chim. Acta (Amsterdam) **4**, 118 (1950); vgl. diese Z. **134**, 367 (1951/52). — [3] Friedrich, A.: Z. angew. Chem. **45**, 476 (1932); vgl. diese Z. **89**, 300 (1932). — [4] Ingram, G.: Mikrochim. Acta (Wien) **1953**, 71; vgl. diese Z. **142**, 69 (1954). — [5] Ingram, G.: Mikrochim. Acta (Wien) **1956**, 877; vgl. diese Z. **153**, 283 (1956). — [6] Kirsten, W.: Mikrochem. verein. Mikrochim. Acta **35**, 217 (1950); vgl. diese Z. **132**, 291 (1951). — [7] Robertson, G. I., L. M. Jett u. L. Dorfman: Analyt. Chemistry **30**, 132 (1958); vgl. diese Z. **164**, 444 (1958).

Dr. F. Salzer, in Fa. Chem. Werke Hüls A.G., Marl (Krs. Recklinghausen)

Brennstoffchemisches Institut der Ruhrkohlen-Beratung GmbH., Essen

Vereinfachtes Verfahren zur Bestimmung des Kohlenstoffs und Wasserstoffs sowie des Schwefels organischer Substanzen

Von

WALTER RADMACHER und ALOYS HOVERATH

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 26. Oktober 1960)

I. Die Bestimmung des Kohlenstoffs und Wasserstoffs

Bei den heute allgemein gebräuchlichen Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Kohlenstoffs und Wasserstoffs organischer Substanzen entweichen zunächst beim Erhitzen der Proben flüchtige Stoffe, die bei den verschiedensten Substanzen in wechselnder Menge und Geschwindigkeit auftreten können, je nachdem, ob die zu analysierende Substanz schwer oder leicht flüchtig ist. Dieses unterschiedliche Verhalten der organischen Verbindungen erschwert den bei dieser Bestimmung erforderlichen gleichmäßigen Verbrennungsablauf. Es sind daher verschiedene automatische Verbrennungsapparaturen konstruiert worden, um die Geschwindigkeit der Verflüchtigung der Substanz zu regulieren[1,2,4,9].

Die gleichmäßige und langsame Entwicklung der flüchtigen Stoffe ist insofern von besonderer Bedeutung, weil bei den üblichen Verfahren nur wenig Sauerstoff für die Oxydation zur Verfügung steht; bei schneller Strömungsgeschwindigkeit würde infolge geringer Kontaktzeit der Entgasungsprodukte mit dem Oxydationsmittel die vollständige Oxydation nicht gewährleistet sein. Daher finden sich im neueren Schrifttum Arbeiten, die sich in erster Linie mit Verbrennungskatalysatoren befassen. KÖRBL u. Mitarb.[3,6] verwenden das thermische Zersetzungsprodukt von Silberpermanganat und weisen auch auf die hohe Wirksamkeit der Oxyde des Eisens, Mangans, Cers und Kobalts hin, wenn diese fein verteiltes Silber enthalten. VEČEŘA u. Mitarb.[11,12] empfehlen Kobaltoxyd auf Asbest als Verbrennungskatalysator.

Die Schwierigkeiten, die bei der Oxydation der in unterschiedlichen Mengen auftretenden flüchtigen Stoffe entstehen können, veranlaßten uns, nach einem einfachen und schnell durchzuführenden Verfahren zu suchen, nach dem sich alle organischen Substanzen analysieren lassen, gleichgültig ob sie leicht oder schwer flüchtig sind und ob sie neben Kohlenstoff und Wasserstoff auch Stickstoff, Schwefel oder Halogene enthalten.

Bei unserem Bestreben, die Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmung zu vereinfachen, war demnach in erster Linie die Frage zu klären, in welcher Weise eine vollständige Oxydation der flüchtig werdenden Stoffe

auf einfachem Wege erzielt werden kann. Vorversuche führten zu der Erkenntnis, daß die zu Beginn der Analyse durch mehr oder weniger starkes Erhitzen der Substanz entweichenden flüchtigen Stoffe sich am besten dadurch einwandfrei oxydieren lassen, daß man sie mit Hilfe eines indifferenten Trägergases durch eine als Brenner wirkende Capillare in einen Verbrennungsraum leitet, in dem sie im Sauerstoffüberschuß verbrannt werden. Die heiße Verbrennungsflamme, die durch die glühende Capillare ermöglicht wird, garantiert die vollständige Oxydation aller Entgasungsprodukte; hierdurch sind weitere Oxydationsmittel und Öfen zu deren Beheizung nicht mehr erforderlich. Die Bestimmung läßt sich in einem entsprechend ausgebildeten einfachen Reaktionsrohr, das nur mit zwei Bunsenbrennern beheizt wird, durchführen. Ein weiterer wesentlicher Vorteil dieser neuartigen Verbrennungsart liegt in der direkten Beobachtung der Verbrennungsflamme, wodurch der Verbrennungsablauf gut zu überwachen und zu steuern ist. Nach Beendigung der Entgasung wird in den Entgasungsraum des Reaktionsrohres Sauerstoff geleitet, um die festen Rückstände zu verbrennen. Schwefeloxyde, Stickoxyde und Halogene werden durch auf etwa 200° C erhitztes Bleidioxyd zurückgehalten. Das bei der Verbrennung der Probe entstehende Wasser und Kohlendioxyd werden in bekannter Weise gravimetrisch bestimmt. Wird ein größerer apparativer Aufwand nicht gescheut, so kann die gravimetrische Bestimmung des Kohlendioxyds auch durch eine Leitfähigkeitsmessung[5,7,10] ersetzt werden.

Arbeitsvorschrift des neuen Verfahrens

Apparatur (Abb. 1)*

Das Reinigungsgerät für den Sauerstoff besteht aus einem Strömungsmesser (*1*) und einem Gefäß, gefüllt mit Natronasbest und Magnesiumperchlorat (*2*).

Das Reinigungsgefäß für den Stickstoff besteht aus einem Blasenzähler mit konz. Schwefelsäure (*6*) und einem Gefäß, gefüllt mit Natronasbest und Magnesiumperchlorat (*7*).

Das Reaktionsrohr aus Quarzglas (*10*) (siehe auch Abb. 2), ist in einen Entgasungsraum, Verbrennungsraum und Absorptionsraum unterteilt. Das Reaktionsrohr wird mit 2 Bunsenbrennern (*19*, *21*) beheizt. Entgasungs- und Verbrennungsraum sind durch eine Scheidewand, die zu einer Capillare (*11*) ausgezogen ist, voneinander getrennt. Vor der Scheidewand befindet sich im Entgasungsraum eine etwa 10 mm lange Quarzwolleschicht (*12*). Unmittelbar hinter der Scheidewand mündet seitlich das Sauerstoffzuleitungsrohr (*4*) in den Verbrennungsraum. 25 mm hinter der Capillare befindet sich im Verbrennungsraum eine 60 mm lange Quarzwolleschicht (*13*), an die sich eine Bleidioxydschicht (*14*) anschließt, die wiederum von einer 10 mm langen Quarzwolleschicht (*15*) und einer Watteschicht von 1 mm Länge begrenzt ist. Die Watte verhindert, daß Quarzwolle in das Absorptionsgefäß gelangt. Der Absorptionsraum ist mit einem Quarzmantel (*16*) umgeben, der mit dem Reaktionsrohr zu einem Stück verblasen ist und einen Einfüllstutzen (*17*) für Schwefelsäure besitzt, der auch als Halterung für ein Thermometer (*18*) dient. Eine verschiebbare Asbestdraht-

* Hersteller Firma W. Feddeler, Laboratoriumsbedarf, Essen, Michaelstraße 24.

netzscheibe (*20*) ermöglicht durch Regulierung der Wärmeabstrahlung des Bunsenbrenners (*19*) die Temperatureinstellung des Absorptionsraumes. Der Gasaustritt

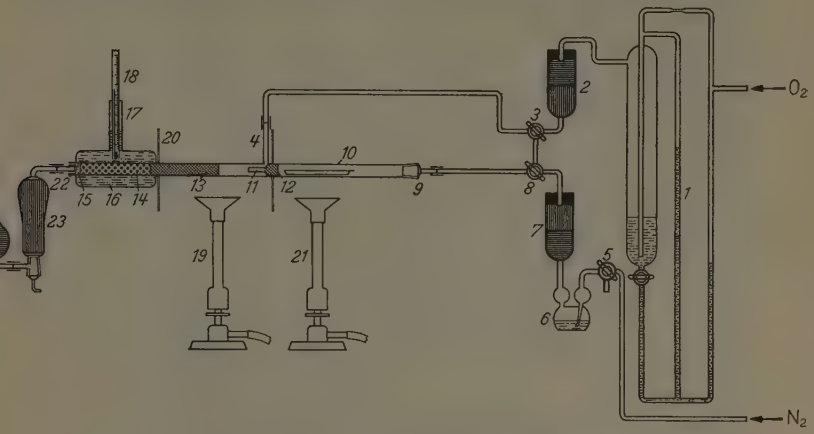


Abb. 1. Apparatur zur Bestimmung von Kohlenstoff und Wasserstoff

des Reaktionsrohres ist mit einem durchbohrten Siliconstopfen (*22*) versehen, an dem bei der gravimetrischen Endbestimmung die Absorptionsgefäße für Wasser (*23*) und Kohlendioxyd (*24*) angeschlossen sind.

Die Absorptionsgefäße für Wasser sind mit Magnesiumperchlorat, die für Kohlendioxyd mit Natronasbest gefüllt.

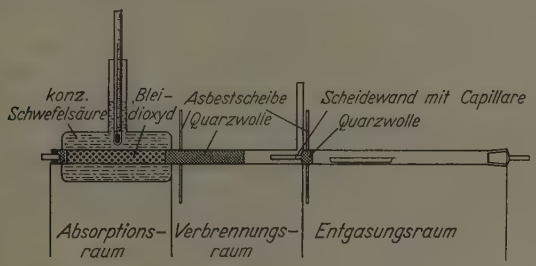


Abb. 2. Reaktionsrohr zur Bestimmung von Kohlenstoff und Wasserstoff

Ausführung der Bestimmung

Der einer Bombe entnommene Sauerstoff wird bei einer Einwaage der zu untersuchenden Substanz von etwa 10 mg mit einer Geschwindigkeit von etwa 70 ml/min, bei einer Einwaage von 60—100 mg mit einer Geschwindigkeit von 120 ml/min, durch die Reinigungsgeräte in den Verbrennungsraum geleitet. Das Trägergas (Argon, Stickstoff) wird einer Bombe entnommen und durch die Reinigungsgeräte über den Schliffstopfen (*9*) des Reaktionsrohres mit einer Geschwindigkeit von etwa 25 ml/min in den Entgasungsraum geführt.

Der Verbrennungsraum wird mit einem Bunsenbrenner so beheizt, daß die Capillare (*11*) glüht. Mit Hilfe der Asbestdrahtnetzscheibe (*20*) wird die Temperatur der Schwefelsäure im Mantel (*16*) auf etwa 200° C eingestellt. An das Reaktionsrohr werden die gewogenen Absorptionsgefäße für Wasser (*23*) und Kohlendioxyd (*24*) angeschlossen. Das Schiffchen mit der zu untersuchenden Substanz wird in den Entgasungsraum eingeführt und das Reaktionsrohr mit dem Schliffstopfen (*9*) verschlossen. Mit einem Bunsenbrenner (*21*) wird das Schiffchen mit der Probe, beginnend am hinteren Ende, erhitzt. Die Destillations- bzw. Zersetzungsprodukte der Probe entzünden sich am Capillarende im Verbrennungsraum, wobei durch die Einstellung der Beheizung des Schiffchens darauf zu achen ist, daß nur eine kleine Flamme entsteht.

Bei zu starker Erwärmung des Schiffchens besteht die Gefahr, daß die Entwicklung der flüchtigen Stoffe zu stark wird und die Sauerstoffmenge zu ihrer vollständigen Verbrennung nicht mehr ausreicht, zu erkennen an einer rötlich-gelben Flammenfärbung oder auch Rußbildung. In diesem Falle kann durch Entfernen des Brenners (*21*) und notfalls durch Kühlen des Entgasungsraumes mit einem nassen Wattebausch sowie durch vorübergehend erhöhte Sauerstoffzufuhr trotzdem eine vollständige Verbrennung erzielt werden.

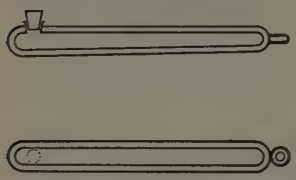


Abb. 3. Wägerohr für leichtflüchtige flüssige Substanzen

Nach Beendigung der Entgasung, das ist nach Erlöschen der Flamme an der Capillare, wird nach Abstellen des Stickstoffstromes (Hahn *5*) durch Umstellen der Hähne (*3*) und (*8*) der Sauerstoff in den Entgasungsraum geleitet, um auch die festen Rückstände zu verbrennen. Nach beendeter Verbrennung wird die Apparatur noch 5 min mit Sauerstoff gespült. Anschließend werden die Absorptionsgefäße abgenommen und zurückgewogen.

Bei der Analyse leicht flüchtiger flüssiger Stoffe wird die Probe mit Hilfe einer Capillare in ein Quarzwägerohr (Abb. 3) gegeben. Man verschließt die Öffnung mit einem Stopfen, der vorher mit dem Quarzrohr zusammen gewogen worden war. Der Stopfen wird erst entfernt, wenn man das Wägerohr in den mit einem nassen Wattebausch gekühlten Entgasungsraum einführt. Die Bestimmung wird wie oben beschrieben durchgeführt. Die Öffnung des Wägerohres ist so bemessen, daß beim Überleiten von Sauerstoff genügend Sauerstoff in das Wägerohr diffundieren kann, so daß eine vollständige Verbrennung der im Wägerohr befindlichen festen Rückstände gewährleistet ist.

Beleganalysen

Tab. 1 vermittelt einen Überblick über die gute Wiederholbarkeit und Zuverlässigkeit der Ergebnisse des neuen Verfahrens. Die Werte lassen weiterhin erkennen, daß Chlor, Schwefel und Stickstoff die Bestimmung des Kohlenstoffs und Wasserstoffs praktisch nicht beeinflussen. Bei diesen Analysen wurde für Einwaagen von 10 bzw. 60 mg eine Halbmikrowaage benutzt.

Die Verbrennung dauert bei einer Einwaage von 60 mg etwa 5—10 min, bei einer Einwaage von 10 mg etwa 90 sec.

Tabelle 1. *Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmung organischer Substanzen*

Substanz	theoretisch		gefunden bei 60 mg Einwaage								gefunden bei 10 mg Einwaage					
			% Kohlenstoff				% Wasserstoff				% Kohlenstoff			% Wasserstoff		
	% C	% H	Einzelwerte			Durchschnitt	Einzelwerte			Durchschnitt	Einzelwerte		Durchschnitt	Einzelwerte		Durchschnitt
Benzoesäure $C_7H_6O_2$	68,84	4,95	68,98	68,83	68,96		5,03	4,91	4,99		68,81	68,45		5,14	5,00	5,01
			68,91	69,00	68,94	68,92	4,94	5,06	4,87	4,97	68,77	68,85	68,72	4,89	5,01	
			68,96	68,90	68,81		4,91	4,93	5,03							
			69,00	68,88	68,90		4,93	5,11	4,95							
Rohrzucker $C_{12}H_{22}O_{11}$	42,11	6,48	42,19	42,04	42,05		6,40	6,52	6,48		42,06	42,16	42,11	6,24	6,20	6,22
			42,21	42,15	42,26	42,13	6,44	6,43	6,44	6,46						
			42,06	42,21	42,01		6,41	6,54	6,50							
Nitron $C_{20}H_{16}N_4$	76,90	5,16	76,98	76,82		76,90	5,26	5,24		5,25						
Isatin $C_8H_5O_2N$	65,30	3,43	65,40	65,25	65,28		3,41	3,44	3,41							
			65,45	65,37	65,41	65,36	3,50	3,47	3,53	3,46						
Nitrophenylhydrazin $C_6H_7O_2N_3$	47,06	4,61	47,20	47,17	47,24		4,64	4,65	4,71		46,78	46,84	46,81	4,64	4,29	4,46
			47,09	46,94	47,00	47,11	4,63	4,55	4,68	4,64						
Sulfanilsäure $C_6H_7O_3NS$	41,61	4,07	41,68	41,66	41,49		4,14	4,08	4,11		41,71	41,93	41,82	3,81	4,20	4,00
			41,70	41,64	41,66	41,64	4,22	4,09	4,09	4,12						
Dimethylaminobenzylidenrhodanin $C_{12}H_{12}ON_2S_2$	54,52	4,58	54,51	54,72			4,60	4,59			54,36		54,36	4,60		4,60
			54,41	54,54		54,54	4,67	4,67		4,63						
Chlorbenzol C_6H_5Cl	64,02	4,48	64,21	64,02		64,12	4,57	4,51		4,54						
Schwefelkohlenstoff CS_2	15,77	—	15,93	16,55		16,24					16,32		16,32			

II. Die Bestimmung des Schwefels

Das bei der Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmung erprobte Verbrennungsprinzip eignet sich auch für die Bestimmung des Schwefels organischer Substanzen.

Das Reaktionsrohr (Abb. 4) aus Quarzglas* ist in einen Entgasungsraum, einen Verbrennungsraum und einen Spülraum unterteilt. Entgasungsraum und Verbrennungsraum mit der zu einer Capillaren ausgezogenen Scheidewand sind genau so beschaffen wie beim Reaktionsrohr für die Bestimmung des Kohlenstoffs und Wasserstoffs. Der Verbrennungsraum, der mit einem Bunsenbrenner erhitzt wird, enthält eine

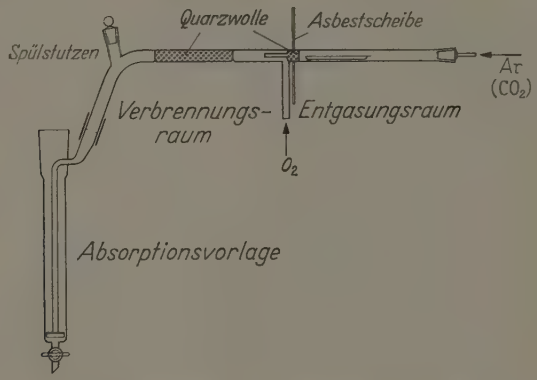


Abb. 4. Reaktionsrohr für die Bestimmung von Schwefel

Quarzwolleschicht, die durch Nocken gehalten wird. Der Spülraum ist nach unten abgebogen, so daß ein einfacher Anschluß an die Absorptionsvorlage ermöglicht wird. An der gebogenen Stelle ist ein mit einem Schliffstopfen verschließbarer Spülstutzen angesetzt. Bei der Bestimmung kann das Ende des Rohres so heiß gehalten werden, daß eine Kondensation von Wasserdampf und Schwefeloxyden vermieden wird. Andererseits ist aber auch eine Spülung durch den Stutzen gefahrlos möglich, da das Reaktionsrohr aus Quarzglas besteht.

Als Trägergas dient an Stelle von Stickstoff Argon oder Kohlendioxyd. Die Entgasung und Verbrennung der Probe wird in der gleichen Weise wie bei der Bestimmung des Kohlenstoffs und Wasserstoffs, jedoch mit erhöhter Sauerstoffgeschwindigkeit durchgeführt. Die Verbrennungsprodukte werden in eine Absorptionsvorlage geleitet und dort in Wasserstoffperoxyd absorbiert. Der Schwefel- bzw. Chlorgehalt wird dann auf bekannte Weise ermittelt. Bei der Verwendung von Kohlendioxyd als

* Hersteller Firma W. Feddeler, Laboratoriumsbedarf, Essen, Michaelstr. 24.

Trägergas muß die Apparatur nach Beendigung der Verbrennung noch mindestens 5 min mit Sauerstoff gespült werden, um das Kohlendioxyd aus der Absorptionsflüssigkeit zu vertreiben.

Beleganalysen

Tab. 2 bringt die Ergebnisse einiger Vergleichsuntersuchungen, aus denen die gute Übereinstimmung der nach dem neuen Verfahren ermittelten Schwefelgehalte mit den Werten des in DIN 51768 festgelegten Verfahrens nach GROTE-KREKELER hervorgeht. Beim Diallylsulfid

Tabelle 2. *Schwefelwerte nach dem Verfahren von Grote-Krekeler und dem neuen Verfahren*

Sulfosalicylsäure $HO_3SC_6H_4OHCO_2H + 2H_2O$			Diallylsulfid* $(CH_2CHCH_2)_2S$		
theoretisch % S	GROTE-KREKELER % S	Neues Verfahren % S	theoretisch % S	GROTE-KREKELER % S	Neues Verfahren % S
12,61	12,25	12,26	28,08	26,52	26,85
	12,23	12,27		26,40	26,88
	12,27				26,85
	12,30				26,76
	12,30				26,73

* Keine chemisch reine Substanz.

handelt es sich nicht um ein Reinprodukt. Für die Durchführung der Bestimmung nach GROTE-KREKELER wurde etwa die dreifache Zeit benötigt wie nach dem neuen Verfahren. Bezüglich weiterer Untersuchungsergebnisse sei auf eine andere Arbeit[8] verwiesen.

Tab. 3 zeigt, daß durch den Stickstoff einer organischen Substanz der Schwefelwert verfälscht werden kann, wenn nur die entstandene Säure

Tabelle 3. *Beeinflussung des Schwefelwertes durch Stickstoff*

Substanz	Formel	theoretisch % N	theoretisch % S	gefunden durch Titration % S		mit $BaCl_2$ gefällt % S	
Thionalid	$C_{12}H_{11}NSO$	6,45	14,76	15,10	15,10	14,73	14,73
Sulfanilsäure	$C_6H_7O_3NS$	8,09	18,51	18,60	18,57	18,65	18,53

titriert wird, da bei der Verbrennung Stickstoffoxyde entstehen können, die in der Vorlage zu Säuren umgesetzt werden. Enthält eine organische Substanz Stickstoff, so muß, wie es auch in der DIN-Vorschrift 51768 bei der Bestimmung nach GROTE-KREKELER beschrieben ist, nach der Verbrennung die Vorlageflüssigkeit mit Bariumchlorid versetzt und das entstehende Bariumsulfat gravimetrisch bestimmt werden.

Am Beispiel des Thionalids ist zu erkennen, daß bei der Titration der Vorlageflüssigkeit etwa 0,4% Schwefel durch die entstandene Salpetersäure zuviel gefunden wird, daß man aber durch Fällen der Sulfationen mit Bariumionen und gravimetrische Bestimmung des gebildeten Bariumsulfats den theoretischen Wert erhält.

Zusammenfassung

Es wird ein neues Verfahren zur Bestimmung des Kohlenstoffs und Wasserstoffs beschrieben. Die neuartige Arbeitsweise ist dadurch gekennzeichnet, daß zunächst die Destillations- bzw. thermischen Zersetzungsprodukte der zu untersuchenden Substanz mit Hilfe eines indifferenten Gases durch eine als Brenner wirkende erhitzte Capillare in den Verbrennungsraum des Reaktionsrohres geleitet werden, in dem sie im reinen Sauerstoffstrom verbrannt werden. Anschließend werden die festen Rückstände im Entgasungsraum mit reinem Sauerstoff vollständig verbrannt. Die sehr heiße Flamme am Capillarende sowie der Sauerstoffüberschuß gewährleisten eine vollständige Verbrennung der Entgasungs- bzw. Destillationsprodukte, so daß weitere Oxydationsmittel nicht erforderlich sind. Die direkte Beobachtung der Verbrennungsflamme gestattet zudem, den Verbrennungsvorgang gut zu überwachen und zu steuern. Der apparative Aufwand für das Verfahren ist gering, da für die Beheizung des Entgasungsraumes sowie des Verbrennungs- und Absorptionsraumes nur zwei Bunsenbrenner erforderlich sind.

Das gleiche Verbrennungsprinzip wird bei dem ebenfalls beschriebenen Verfahren zur Bestimmung des Schwefels angewandt.

Literatur

[1] Bobrański, B.: Mikrochim. Acta (Wien) **1956**, 1735; vgl. diese Z. **158**, 214 (1957). — [2] Fischer, F. O.: Analyt. Chemistry **21**, 827 (1949); vgl. diese Z. **130**, 447 (1949/50). — [3] Horáček, J., u. J. Körbl: Chem. and Ind. **1958**, 101; vgl. diese Z. **163**, 202 (1958). — [4] Kainz, G.: diese Z. **166**, 427 (1959). — [5] Koch, W., u. H. Malissa: Arch. Eisenhüttenwes. **27**, 695 (1956); vgl. diese Z. **158**, 61 (1957). — [6] Körbl, J.: Mikrochim. Acta (Wien) **1956**, 1705; vgl. diese Z. **157**, 34 (1957). — [7] Malissa, H.: Mikrochim. Acta (Wien) **1957**, 553; vgl. diese Z. **160**, 287 (1958). — [8] Radmacher, W., u. A. Hoverath: Brennstoff-Chem. **1960**, 304. — [9] Stehr, E.: Analyt. Chemistry **31**, 1274 (1959); vgl. diese Z. **174**, 201 (1960). — [10] Stuck, W.: Mikrochim. Acta (Wien) **1960**, 421. — [11] Synek, L., u. M. Večeřa: Chem. Listy **51**, 1551 (1957); vgl. diese Z. **161**, 281 (1958). — [12] Večeřa, M., D. Šnobl u. L. Synek: Mikrochim. Acta (Wien) **1958**, 9; vgl. diese Z. **163**, 384 (1958).

Dr. W. Radmacher, Dr. A. Hoverath, Brennstoffchem. Institut d. Ruhrkohlenberatung G.m.b.H., Essen, Frau Bertha Krupp-Straße 4

Organisch-Chemisches Institut der Technischen Hochschule München

Manometrisches Verfahren zur C-H-Analyse mit Einwaagen ab 0,3 Milligramm

Von

H. Simon und G. Müllhofer

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 9. November 1960)

Die klassischen Verfahren der Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmung sind sowohl für die immer mehr an Bedeutung gewinnende Analyse kohlenstoffmarkierter Verbindungen, wie auch für Analysen mit Einwaagen unter 1 mg ungeeignet. Folgende 3 Gründe sprechen gegen die normale C-H-Analyse, falls der ^{13}C- oder ^{14}C-Gehalt von Substanzen bestimmt werden soll:

1. Bei einer gegebenen Apparatur und bei einer gegebenen Arbeitsvorschrift sind die Grenzen der Kohlenstoff- und Wasserstoffmengen, die pro Analyse anfallen können, relativ eng begrenzt, falls genaue Werte erhalten werden sollen. Einwaagen des gleichen Materials, die sich mengenmäßig um den Faktor 5—10 unterscheiden, sind fast immer unmöglich, wenn die Fehler einigermaßen klein gehalten werden sollen. Besonders bei unmittelbar aufeinanderfolgenden Analysenproben ist häufig sogar ein Unterschied um den Faktor von 2—3 Grund für fehlerhafte Ergebnisse. Beim Arbeiten mit radioaktivem Kohlenstoff ist es jedoch von großem Vorteil, wenn man ein Analysenverfahren besitzt, bei dem die Genauigkeit der Ergebnisse innerhalb eines weiten Bereichs von der Größe der Einwaage unabhängig ist.

2. Die Verfahren sind nicht blindwertfrei. Dieser Fehler wird im Routinebetrieb kompensiert. Bei der Analyse markierter Verbindungen jedoch, deren Isotopengehalt sich um mehrere Größenordnungen unterscheiden kann, führt der Blindwert zu sogenannten Memory-Effekten, die in besonders ungünstigen Fällen Fehler in der Isotopenbestimmung von einigen 100% bewirken können.

3. Da die empfindlichsten und genauesten Verfahren zur Bestimmung des Isotopengehaltes von Kohlenstoff in der Gasphase ausgeführt werden, ist es zweckmäßig, das entstehende Kohlendioxyd als solches in seiner Menge zu bestimmen, ohne es vorher durch eine chemische Reaktion in eine feste Form zu überführen und dann gravimetrisch oder titrimetrisch zu bestimmen.

Die Durchführung der klassischen C-H-Analyse mit Einwaagen unter 1 mg ist, wie kürzlich Kuck u. Mitarb.[7] gezeigt haben, aus einer Reihe von Gründen nicht möglich. Im wesentlichen rührt dies daher, daß die

Meßgrößen bei den gravimetrischen Verfahren, d. h. also die Gewichtsdifferenzen der Wägeröhrchen im selben Verhältnis kleiner werden als die Einwaagen, ohne daß sich die Absolutgewichte der Wägeröhrchen und die Menge der Rohrfüllung entsprechend verkleinern läßt.

Die genannten Gründe stellen teilweise auch Nachteile bei der normalen C-H-Bestimmung dar. Um diese zu überwinden, wurden beispielsweise Verfahren ausgearbeitet, um in leeren Rohren zu verbrennen[6]. Es gibt neben den vielen Methoden der Naßverbrennung auch eine Anzahl von Verfahren, zur ^{14}C-Analyse, bei denen eine Reihe von Änderungen vorgenommen sind, um eine bessere Anpassung an Bedürfnisse der Isotopenanalyse zu erreichen[1,3,4,9]. Die meisten von ihnen weisen jedoch noch den einen oder anderen der drei geschilderten Nachteile auf, wenn auch in abgeschwächter Form.

Für den Blindwert der normalen C-H-Analysenverfahren sind die im Vergleich zur durchgesetzten Substanz sehr große Katalysatormengen verantwortlich. Die Verbrennung der Substanzen kann nur mit wesentlich kleineren Mengen Oxydationsmitteln erreicht werden, wenn man die Verweilzeit der zu oxydierenden Proben mit den Oxydationsmitteln erhöht. Dies geschieht zweckmäßig, indem man die Substanzen zusammen mit Oxydationsmitteln in verschlossenen Glasrohren erhitzt. Ein solches Verfahren wurde von Wilzbach u. Sykes[12] kurz beschrieben. Dabei werden die organischen Substanzen zusammen mit Kupferoxyd und Kupfer in einem evakuierten Rohr auf 650° C erhitzt. Nach unseren Erfahrungen und der von anderen lassen sich nach dieser Methode viele Verbindungen gut analysieren. Es kommt jedoch nicht selten vor, daß zu geringe Kohlenstoffwerte erhalten werden[2,11]. Dies läßt sich umgehen, wenn die Verbrennung mit Kaliumperchlorat und Kupferoxyd durchgeführt wird. Für Substanzen, die nur die Elemente Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff enthalten, genügt der Zusatz von Kaliumperchlorat als einziges Oxydationsmittel[11]. Werden diese, die Verbrennungsprodukte enthaltenden Rohre in einem evakuierten System geöffnet, und das Kohlendioxyd und das Wasser in einem passend gewählten Volumen manometrisch gemessen, so hat man ein Verfahren, bei dem die Genauigkeit innerhalb weiter Grenzen von der Einwaage unabhängig ist, keine Memory-Effekte auftreten, und das Kohlendioxyd nach seiner mengenmäßigen Bestimmung direkt in ein Gaszählrohr oder eine Ionisationskammer überführt werden kann[11]. Die mengenmäßige Bestimmung des Wasserdampfs erfolgt zweckmäßigerweise in einem Zweiflüssigkeitsmanometer, wie es Naughton u. Frodyma[8] bzw. Schöniger[10] verwendeten.

Wie weiter unten beschrieben wird, haben wir diese Zweiflüssigkeitsmanometer jedoch etwas modifiziert. Da wir nach dieser Methode bei Einwaagen zwischen 4 und 40 mg Resultate erhalten haben, die in ihrer Genauigkeit der der üblichen klassischen Verfahren entsprechen[11],

haben wir versucht, dieses Verfahren in einer modifizierten Apparatur auch für Einwaagen von 0,3—2,0 mg anzuwenden. Wir versuchten es vor allem deshalb, weil die Steighöhen der Manometer als Meßgrößen für die Kohlendioxyd- und Wassermengen bei geeigneter Volumenwahl in

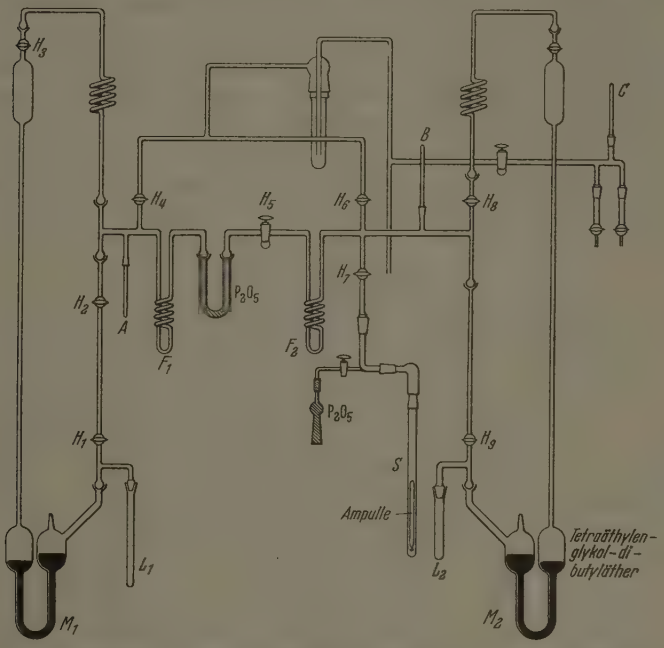


Abb. 1. Vakuumapparatur zur manometrischen Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmung

gleicher Größe erhalten werden können, wie bei 10 oder 100 mal größeren Einwaagen. Ein im Prinzip ähnliches Verfahren wurde von KIRSTEN[5] beschrieben.

Beschreibung der Apparatur

Die Apparatur (Abb. 1) besteht aus zwei Zweiflüssigkeitsmanometern (M_1, M_2). Die beiden Füllflüssigkeiten sind Quecksilber und Tetraäthylenglykol-di-n-butyläther. Die Manometer besitzen im Gegensatz zu dem von NAUGHTON und FRODYMA angegebenen jedoch auch einen Hahn am Ende des Schenkels der mit der leichteren Flüssigkeit gefüllt ist. Dieser Hahn erleichtert das Füllen des Manometers und ermöglicht auch das Evakuieren dieses Schenkels, wenn Luft oder sonstige Gase eingedrungen sind. Ohne diesen Hahn ist das Füllen des Manometers schwierig und es kann durch einen Gaseinbruch wertlos werden. Die Verwendung von zwei Manometern hat den Vorteil, daß das Kohlendioxyd und das Wasser sich gleichzeitig equilibrieren können. An der Apparatur befindet sich weiterhin ein Quarzrohr S, in dem die Ampullen, die die Verbrennungsprodukte enthalten, geöffnet werden. Die Fallen

F_1 und F_2 dienen zur Trennung von Kohlendioxyd und Wasserdampf durch fraktioniertes Ausfrieren. Die Quarzwollstopfen in den Fallen dienen dazu, das Wasser und das Kohlendioxyd quantitativ aus dem Strom der nicht kondensierbaren Gase auszufrieren. In den zwei Ausfrierfingern L_1 und L_2 wird das Kohlendioxyd und Wasser zur anschließenden manometrischen Messung kondensiert. Das Volumen von L_1 wurde möglichst klein gehalten, um große Steighöhen je Milligramm Kohlenstoff zu erreichen. Beim Wassermanometer wurde das Volumen von L_2 so gewählt, daß auch bei der Analyse von Substanzen mit sehr hohem Wasserstoffgehalt der Sättigungsdampfdruck von Wasser bei der entsprechenden Temperatur maximal nur etwa zur Hälfte erreicht wird. Der Sättigungsdampfdruck zeigt in diesem Wassermanometer bei 27° C eine Steighöhe von 323 mm. Zwischen H_5 und F_1 befindet sich ein mit P_2O_5 auf Glaswolle gefülltes U-Rohr. Die Apparatur ist über die Hähne H_4 und H_6 an eine Vakuumpumpe angeschlossen. Als Vakuummeßgerät wird ein Vakuummeter der Firma LKB benutzt. Die Vakuummeßstellen befinden sich bei A, B, und C. Zum Aufbau der Apparatur wurden soweit wie möglich Kugelschliffe verwendet, die mit Picein gedichtet wurden. Die Hähne werden mit Siliconfett geschmiert.

Durchführung einer Analyse

A. Die Einwaage der Substanzen

Die Substanz wird in kleinen, selbst angefertigten Platinschiffchen (Gewicht etwa 115 mg) auf einer Ultramikro-Quarzfaden-Torsionswaage* eingewogen. (Bei Einwaagen von 1—2 mg müssen die Fallen L_1 und L_2 etwas vergrößert werden.) Die Platinschiffchen werden vorsichtig in einseitig geschlossene Supremaxrohre von 120 mm Länge, 6 mm innerem Durchmesser und 1 mm Wandstärke gebracht. Die Rohre (Abb. 2) tragen an ihrem einen Ende eine leicht brechbare Spitze.

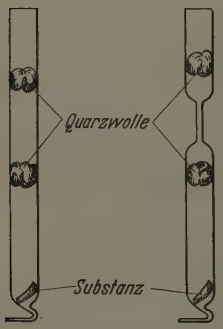


Abb. 2. Verbrennungsampulle

Vor dem Einbringen der Substanz werden die Ampullen bei 650° C in einem Muffelofen ausgeglüht. Zur Substanz werden etwa 3—4 mg $KClO_4$ und 6—8 mg ausgeglühtes CuO gebracht. Eine größere Menge Kaliumperchlorat wurde zuvor fein gepulvert und bei 350° C im Hochvakuum (10^{-3} Torr) etwa 5 Std ausgeheizt. Dann werden zwei ausgeglühte Quarzwollstopfen in das Supremaxrohr hineingebracht, zwischen denen es dann vor einem Gebläse verengt wird (Abb. 2). Der obere Rand wird rund geschmolzen und das Röhrchen mit einem Vakuumschlauch bei C an die Apparatur angeschlossen, auf 10^{-3} Torr ausgepumpt und schließlich abgeschmolzen. Die Substanz wird mit $KClO_4$ und CuO vermischt und die Ampulle 45 min bei 650° C in einen Muffelofen gebracht.

B. Das Öffnen der Verbrennungsampullen und die Messung des CO_2 und des Wassers

Die Apparatur wird auf 10^{-2} Torr ausgepumpt, dabei sind alle vorhandenen Hähne geöffnet. Die Rückdiffusionsfalle ist mit flüssiger Luft gekühlt. Anschließend wird H_7 geschlossen, das Rohr S über ein mit P_2O_5 gefülltes Trockenröhrchen und einen kleinen Hahn belüftet und abgenommen. Die mit einem Rehleder gewischte

* Modell: Rodder, Belastbarkeit 200 mg, Empfindlichkeit 0,1 μg (Herr Dr. F. Weigel stellte uns zu Beginn unserer Untersuchungen eine solche Waage zur Verfügung, wofür wir ihm an dieser Stelle herzlich danken).

Ampulle wird mit der leicht brechbaren Spitze nach unten vorsichtig eingebracht. Das Rohr S wird wieder an die Apparatur angeschlossen und auf 350° C geheizt. H_8, H_9, H_5 und H_4 werden geschlossen. Dann wird H_7 geöffnet und das Rohr S evakuiert. Sobald das Arbeitsvakuum erreicht ist, etwa 10^{-2} oder besser, können H_5 und H_4 wieder geöffnet werden. Die Hähne H_2, H_3, H_6 und H_7 werden geschlossen. Die Fallen F_1 und F_2 werden mit flüssiger Luft gekühlt und der Ofen von Rohr S entfernt. Durch Drehen des Rohres S wird die Ampulle bis zur Nase gebracht. Darauf wird das Rohr S nach unten gedreht, die Ampulle fällt herab und wird geöffnet. Der Ofen wird wieder über S gebracht und H_7 langsam geöffnet. Dabei soll der Druck in der Apparatur 3 Torr nicht überschreiten. Schließlich wird H_7 ganz geöffnet und über die Fallen F_1 und F_2 durch H_4 evakuiert. H_4 und H_5 werden sodann geschlossen, die flüssige Luft an der Falle F_2 durch eine Kältemischung aus Aceton/CO_2 ersetzt, H_5 wird nun langsam geöffnet, um das Kohlendioxyd von der Falle F_2 in F_1 überzufrieren. H_5 und H_7 werden geschlossen und der Heizofen entfernt, worauf H_2 und H_9 geöffnet werden. Die Kühlung wird von F_1 und F_2 entfernt und die Manometerfinger L_1 und L_2 mit flüssiger Luft gekühlt. Alle Überführungen werden an den beiden Vakuummeßstellen überprüft. H_1 und H_9 werden geschlossen. H_3, H_4, H_6 und H_8 werden geöffnet und der Nullpunkt an beiden Manometern abgelesen. Nun wird die Kühlung von L_1 und L_2 entfernt und die Ausfrierfinger mit einem Wasserbad auf Zimmertemperatur gebracht. Nach 5—10 min werden die Steighöhen und Temperaturen abgelesen.

C. Eichung der Apparatur und Berechnung der Analysenergebnisse

Die Eichung der Apparatur erfolgt durch eine Serie von Analysen mit unterschiedlichen Einwaagen.

Die beobachteten Wertepaare von Steighöhe in Millimeter und Mikrogramm Kohlenstoff bzw. Wasserstoff, die aus der Einwaage berechnet sind, werden in ein rechtwinkliges Koordinatensystem eingetragen und die resultierende Kurve durch eine Gleichung folgender allgemeiner Form dargestellt:

$$Y = A + BX + CX^2 .$$

Dabei sind X die Steighöhen und Y die Gewichtsmengen von Kohlenstoff bzw. Wasserstoff.

Die Reproduzierbarkeit wird in Tab. 1 wiedergegeben:

Tabelle 1. *Reproduzierbarkeit der Analysen von Bernsteinsäure*

Substanz	Einwaage (μg)	gefunden % C	gefunden % H	gefunden Atomverhältnis C : H
Bernsteinsäure	617,02	40,85	5,15	0,669 : 1
% C ber. 40,68	908,91	40,69	5,14	0,664 : 1
% H ber. 5,12	658,58	40,91	5,18	0,663 : 1
Atomverhältnis	574,01	40,55	5,02	0,678 : 1
C : H = 0,667 : 1	396,78	40,41	5,20	0,652 : 1
	328,10	40,68	5,06	0,674 : 1
	781,83	40,41	5,05	0,671 : 1
	580,89	40,61	5,16	0,661 : 1

Mittlere Abweichung bei Wasserstoff $\pm$ 0,08%.
Mittlere Abweichung bei Kohlenstoff $\pm$ 0,18%.
Mittlere Abweichung bei den Atomverhältnissen $\pm$ 0,006.

Tab. 2 gibt die Analysenergebnisse einer Reihe von anderen Substanzen wieder:

Tabelle 2. *Analysenergebnisse mit verschiedenen Verbindungen*

Substanz	Einwaage (μg)	berechnet % C	gefunden % C	berechnet % H	gefunden % H
Pentaacetyl-	473,11	49,23	49,31	5,68	5,78
glucose	367,97		49,29		6,27
Nitrobenzoe-	408,00	50,31	50,07	3,02	2,94
säure	489,43		50,05		3,09
Sulfonal	1195,61	36,82	36,77	7,06	7,16
	638,86		36,71		6,63
Pyramidon	529,47	67,51	67,28	7,41	7,13
	336,35		67,52		7,12
	378,51		67,95		7,41
Bernsteinsäure	552,84	40,68	40,45	5,12	4,89
	534,48		40,17		4,87
	315,18		40,45		5,48
	666,32		40,12		5,17
	990,17		40,64		5,36
p-Chloracetanilid	654,08	56,65	56,75	4,75	4,67
	349,18		56,13		4,62
	805,89		56,95		4,83
Thioharnstoff	1246,78	15,78	15,84	5,30	5,38
	742,65		16,32		5,16

Werden die Einwaagen größer gewählt und das Volumen entsprechend vergrößert, so zeigen sich folgende Genauigkeiten (3 Analysenserien):

1. 9 Bernsteinproben zwischen 1,04757 und 1,75573 mg zeigen für Wasserstoff eine mittlere Abweichung von $\pm$ 0,06% und für Kohlenstoff +0,08%. Die mittlere Abweichung vom Atomverhältnis 0,667 : 1 beträgt $\pm$ 0,007.

2. 8 Bernsteinsäureproben zwischen 0,75772 mg und 1,84592 mg zeigen für Wasserstoff eine mittlere Abweichung von $\pm$ 0,09% und für Kohlenstoff $\pm$ 0,18%. Die mittlere Abweichung vom Atomverhältnis 0,667 : 1 beträgt $\pm$ 0,009.

3. 6 Bernsteinsäureproben zwischen 0,82678 mg und 1,33832 mg zeigen für Wasserstoff eine mittlere Abweichung von 0,06% und für Kohlenstoff $\pm$ 0,11%. Die mittlere Abweichung vom Atomverhältnis 0,667 : 1 beträgt $\pm$ 0,007.

Die Analysenergebnisse dieser 3 Serien wurden linear berechnet. Eine Berechnung der Ergebnisse nach der auf S. 89 angegebenen Formel würde merklich bessere Ergebnisse zeigen.

Abschließend sei noch auf einige Vorteile dieser Methode für die Elementaranalyse gegenüber den klassischen Verfahren hingewiesen: Auch nach längerem Stehen braucht die Apparatur nicht wieder durch Testanalysen

equilibriert zu werden, wie das bei der normalen C-H-Analyse der Fall ist. Sie dürfte sich daher für Laboratorien eignen, in denen nur einige C-H-Analysen pro Woche anfallen. Metallorganische Verbindungen mit Schwermetallen, die mitunter zur Carbidbildung neigen, werden durch das sich in der Bombe bildende Wasser zersetzt.

Leicht zersetzliche Substanzen können eingewogen und verbrannt werden, ohne daß die Analyse unmittelbar nach der Herstellung der Substanz durchgeführt werden muß. Die Verbrennung muß nicht beaufsichtigt werden.

Die C-H-Verhältnisse können ohne Wägung bestimmt werden.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für ein Stipendium, Herrn Prof. Dr. F. Weygand für sein ständiges Interesse und seine Sachbeihilfen und schließlich Fräulein H. Pflaumer für geschickte Mitarbeit.

Literatur

[1] Anderson, R. C., Y. Delabarre u. A. A. Bothner-By: Analyt. Chemistry **24**, 1298 (1952); vgl. diese Z. **141**, 59 (1954). — Christman, D. R., N. E. Day, P. R. Hansell u. R. C. Anderson: Analyt. Chemistry **27**, 1935 (1955); vgl. diese Z. **153**, 41 (1956). — [2] Buchanan, D. L., u. B. J. Corcoran: Analyt. Chemistry **31**, 1635 (1959); vgl. diese Z. **175**, 63 (1960). — [3] Glascock, R. F.: Biochemic. J. **52**, 699 (1952). — Glascock, R. F.: Isotopic Gas Analysis for Biochemists, Academic Press, New York, 1954. — [4] Horáček, J., u. D. Grünberger: Chem. Listy **51**, 1944 (1957); vgl. diese Z. **161**, 375 (1958). — [5] Kirsten, W.: Analyt. Chemistry **26**, 1097 (1954); Mikrochim. Acta (Wien) **1956**, 836; Chim. analytique **40**, 253 (1958); vgl. diese Z. **145**, 352 (1955); **153**, 293 (1956); **167**, 288 (1959). — [6] Körbl, J. (Übersichtsarbeit): Ind. Chemist **34**, 507 (1958). — [7] Kuck, J. A., P. L. Altieri u. A. K. Towne: Mikrochim. Acta (Wien) **1954**, 1; vgl. diese Z. **145**, 38 (1955). — [8] Naughton, J. J., u. M. M. Frodyma: Analyt. Chemistry **22**, 711 (1950); vgl. diese Z. **135**, 73 (1952). — [9] Rutschmann, J., u. W. Schöniger: Helv. chim. Acta **40**, 428 (1957); vgl. diese Z. **159**, 226 (1957/58). — [10] Schöniger, W.: Helv. chim. Acta **39**, 650 (1956); Mikrochim. Acta (Wien) **1957**, 545; vgl. diese Z. **153**, 288 (1956); **160**, 303 (1958). — [11] Simon, H., H. Daniel u. J. F. Klebe: Angew. Chem. **71**, 303 (1959); vgl. diese Z. **175**, 63 (1960). — [12] Wilzbach, K. E., u. W. Y. Sykes: Science (Lancaster, Pa.) **120**, 494 (1954); vgl. diese Z. **149**, 296 (1956).

Dr. H. Simon, Dipl.-Chem. G. Müllhofer,
Organisch-Chemisches Institut der Technischen Hochschule, München 2, Arcisstr. 21

Organisch-analytisches Laboratorium der Knapsack-Griesheim AG,
Werk Knapsack bei Köln

Eine schnelle Sauerstoffbestimmung in organischen Substanzen

Von

A. Götz (unter Mitarbeit von **H. Bober**)

Mit 8 Textabbildungen

(Eingegangen am 26. Oktober 1960)

Im Jahre 1904 versuchte Markert[3] die sauerstoffhaltige Substanz mit Graphit zu glühen, um den Sauerstoff in Kohlenmonoxyd überzuführen. Dieses sollte durch Umsetzung mit Jodpentoxyd als Kohlendioxyd bestimmt werden. Jedoch waren die damals zur Verfügung stehenden Hilfsmittel noch nicht dazu geeignet, aus der an sich guten Idee eine brauchbare Bestimmungsmethode werden zu lassen. Auch Methoden der Sauerstoffbestimmung durch katalytische Hydrierung, wie sie von Ter Meulen[5], Lindner u. Wirth[2] u. a. vorgeschlagen wurden, haben keinen Eingang in der Mikroanalyse gefunden. Erst Schütze[4] gelang es 1939 ein brauchbares Halbmikroverfahren nach der Methode von Markert auszuarbeiten, das Zimmermann[7] in den Mikromaßstab übertrug. Unterzaucher[6] hat nun die Schützesche Methode dahin modifiziert, daß er nicht das Kohlendioxyd gravimetrisch bestimmt, sondern das Kohlenoxyd mit Anhydrojodsäure HJ_3O_8 oxydiert und die äquivalente Menge Jod nach Leipert maßanalytisch bestimmt.

Wir versuchten nun, einmal die eingewogene Substanz nicht langsam bei 700—800° C im N_2-Strom zu vercracken, sondern die Substanz schnell in eine 1120° C heiße Zone einzubringen, wobei sie sofort völlig vercrackt wird. Zum zweiten wollten wir das nach der Konvertierung am C-Kontakt gebildete CO *direkt* durch Wärmeleitfähigkeitsmessung bestimmen.

Das letzte haben 1950 Harris, Smith u. Mitchell jr.[1] auch durchgeführt. Die Autoren vercracken allerdings die Substanz bei etwa 600° C im Heliumstrom, konvertieren dann bei 1100—1150° C, entfernen den Wasserstoff dadurch, daß sie das Gasgemisch durch ein geheiztes Pd-Rohr 3mal im Vakuum strömen lassen und messen dann die Änderung der Wärmeleitfähigkeit von Helium gegenüber CO. Der apparative Aufwand dieser Methode erscheint allerdings sehr groß.

Experimentelles

Beschreibung der Apparatur. Abb. 1 zeigt das Schema der Apparatur. Durch ein Einlaßsystem (*1*), das eine Gasspülung enthält, wird die Substanz in den Ofen (*2*) eingeführt. Der Ofen ist aufklappbar und die Temperatur im Inneren des waagerechten Quarzrohres, das mit Gasruß CK 3 der Firma Degussa gefüllt ist, beträgt 1120° C.

Die Länge der Rohrfüllung beträgt 350 mm. Hinter dem Ofen befindet sich eine Metallspirale zur Kühlung (*3*). Nach der Spirale ist eine gaschromatographische

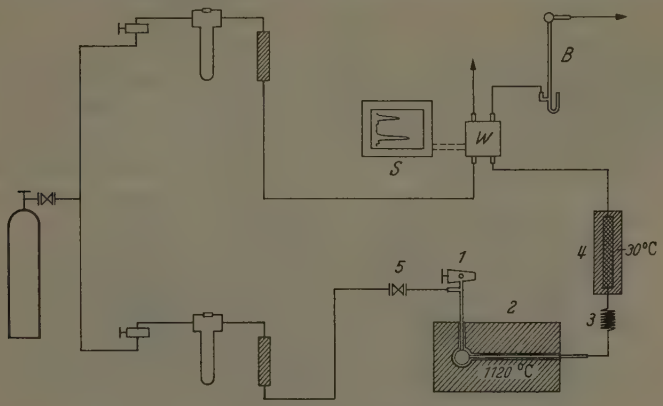


Abb. 1. Schema der Apparatur

Säule von 500 cm Länge, 0,6 cm innerem Durchmesser und einer Temperatur von 30° C angeordnet. Die Säule (*4*) ist mit Aktivkohle (Bayer) von der Körnung 0,5 mm gefüllt. (*W*) stellt eine Wärmeleitfähigkeitszelle und (*B*) ein Seifenblasenmanometer

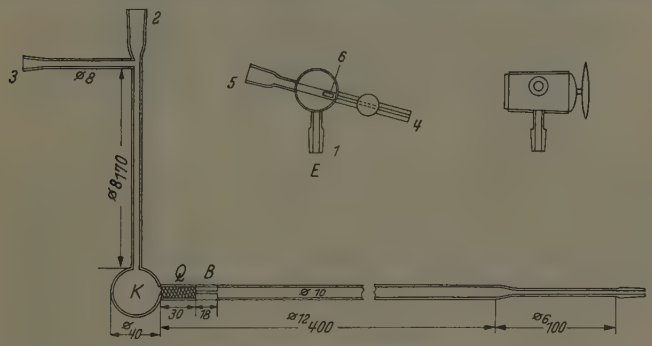


Abb. 2. Verbrennungsvorrichtung

dar, das der Kontrolle der Strömungsgeschwindigkeit dient. Die Wärmeleitfähigkeitszelle wird von dem Vergleichsgasstrom und dem Meßgasstrom in bekannter Weise durchströmt. Als Trägergas dient Wasserstoff. (*S*) stellt einen Kompensationsschreiber bzw. einen Integrator dar.

Die Abb. 2 zeigt die Quarzapparatur, die der Verbrennung dient. Die Einfüllvorrichtung (*E*) sitzt mit dem Schliffkern (*1*) in der Hülse (*2*). Bei (*3*) strömt Wasserstoff mit einer Geschwindigkeit von 2,5 ml/sec durch die Apparatur. Durch (*4*) strömt

ein schwacher Wasserstoffstrom (etwa 1 ml/sec) an dem durch (*5*) eingeführten Platinnäpfchen (6) ins Freie vorbei. Das Näpfchen hat eine Höhe von 8 mm und einen Durchmesser von 5 mm. Das waagerechte Rohr ist kurz hinter der Quarzkugel (*K*) auf eine Länge von 30 mm mit Quarzwolle (*Q*) gefüllt. Dahinter ist das Rohr in einer Länge von 18 bis 20 mm auf 1—2 mm lichte Weite verengt (*B*). Hinter der Verengung ist das Rohr mit dem oben erwähnten Kohlekontakt gefüllt.

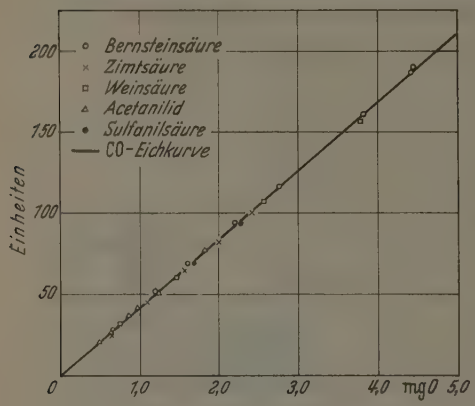


Abb. 3. CO-Eichkurve (Messung der Peakflächen)

Ausführung der Bestimmung. (Abb. 2). Die Substanz (etwa 2 bis 30 mg je nach Sauerstoffgehalt) wird in das Platinnäpfchen eingewogen und durch (*5*) in die Bohrung des Dreiwegehahnes eingeschoben, während durch (*4*) ein schwacher Wasserstoffstrom geht. Durch Drehen des Hahnes fällt das Näpfchen in die Kugel (*K*), die im Ofen auf 1120° C geheizt ist. Hier wird die Substanz zersetzt und mit dem durch (*3*) nachströmenden Wasserstoff werden die Zersetzungsprodukte durch das waagerechte Rohr weggeführt. Nach Abkühlung über die Metallspirale (*3*) (Abb. 1) gelangen sie auf die

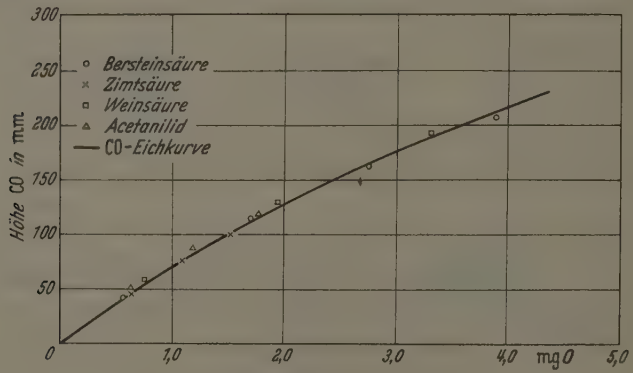


Abb. 4. CO-Eichkurve (Messung der Peakhöhen)

chromatographische Säule (*4*). Die dem Sauerstoff äquivalente Menge CO wird dann wie üblich in einer Wärmeleitfähigkeitskammer gemessen und an einem Integrator angezeigt. Flüssige, leicht flüchtige Substanzen werden in eine Capillare eingewogen, die etwas kürzer ist als die Bohrung des Dreiwegehahnes. Die Capillare läßt man genauso wie das Platinnäpfchen durch Drehen des Hahnes in die Kugel (*K*) fallen.

Zur Auswertung wird eine Eichkurve mit reinem CO aufgenommen. Die am Integrator abgelesenen Impulseinheiten ergeben dann direkt die Sauerstoffmenge.

Ergebnisse

Abb. 3 zeigt die CO-Eichkurve mit einigen gemessenen Werten von Bernstein-, Zimt-, Weinsäure, Acetanilid und Sulfanilsäure. Die Kurve zeigt die völlige Linearität der Peakflächen mit der CO-Konzentration. Mißt man nur die Peakhöhen aus, so ist die Linearität der Peakhöhen mit der Sauerstoff- bzw. CO-Konzentration nicht vorhanden, so daß man

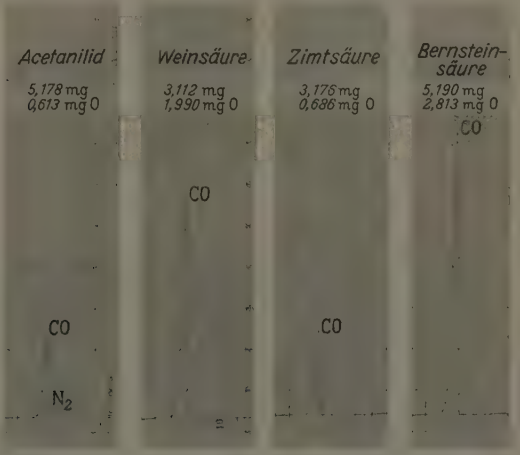


Abb. 5. Gestalt und Höhe der gemessenen CO-Peaks (Trägergas: Wasserstoff)

eine gekrümmte Kurve erhält (Abb. 4). Die Gestalt und Höhe der gemessenen CO-Peaks zeigt die Abb. 5. Hier wurde mit einem Heizstrom für die Wärmeleitfähigkeitskammer von 180 Milliamp. und einer Schreiberempfindlichkeit von 40 mV gearbeitet. Unter den gewählten Versuchsbedingungen beträgt die Zeit für eine O-Bestimmung 6 min. Da die Kugel (*K*) in Abb. 2 etwa 20 Platinnäpfchen faßt, lassen sich hintereinander bequem 20 Bestimmungen in ungefähr 2 Std durchführen.

Die Tabelle zeigt die berechneten und gefundenen Werte einiger Testsubstanzen.

Eine Ansicht der Gesamtapparatur zeigt Abb. 6.

Diskussion der Ergebnisse

1. Die Schnelligkeit der Sauerstoffbestimmung basiert darauf, daß die Substanz in einer Quarzkugel bei 1120° C spontan zersetzt wird und nicht, wie üblich, langsam durch Aufheizen mit einem Brenner.

Tabelle. *Berechnete und gefundene Werte einiger Testsubstanzen*

Substanz	Einw. in mg	O in mg		O in Gew.-%		Fehler	
		ber.	gef.	ber.	gef.	abs.	rel.
Bernsteinsäure	4,043	2,191	2,202	54,20	54,46	+ 0,26	+ 0,5
	5,056	2,740	2,740		54,20	0	0
	7,012	3,800	3,775		53,84	− 0,36	− 0,7
	8,155	4,420	4,462		54,71	+ 0,51	+ 0,9
	8,078	4,378	4,404		54,52	+ 0,32	+ 0,6
	2,922	1,584	1,600		54,76	+ 0,56	+ 1,0
	5,042	2,733	2,750		54,54	+ 0,34	+ 0,6
	7,151	3,876	3,940		55,10	+ 0,90	+ 1,7
	4,188	2,270	2,276		54,35	+ 0,15	+ 0,3
	7,997	4,334	4,294		53,70	− 0,50	− 0,9
	8,974	4,864	4,815		53,66	− 0,54	− 1,0
	2,927	1,586	1,577		53,88	− 0,32	− 0,6
	5,011	2,716	2,696		53,80	− 0,40	− 0,7
Zimtsäure	4,991	1,078	1,060	21,60	21,24	− 0,36	− 1,7
	7,190	1,553	1,526		21,22	− 0,38	− 1,8
	9,160	1,979	1,934		21,11	− 0,49	− 2,3
	11,131	2,404	2,365		21,25	− 0,35	− 1,6
	2,947	0,636	0,645		21,89	+ 0,29	+ 1,3
	5,008	1,082	1,045		20,87	− 0,73	− 3,4
	6,932	1,497	1,455		20,99	− 0,61	− 2,8
	3,201	0,691	0,687		21,46	− 0,14	− 0,6
	5,134	1,109	1,120		21,82	+ 0,22	+ 1,0
	7,016	1,515	1,515		21,60	0	0
	4,005	1,945	1,945		21,60	0	0
	11,044	2,385	2,380		21,55	− 0,05	− 0,2
Weinsäure	1,140	0,729	0,734	63,96	64,38	+ 0,42	+ 0,7
	2,249	1,438	1,421		63,18	− 0,78	− 1,2
	4,970	3,179	3,205		64,49	+ 0,53	+ 0,8
	2,238	1,431	1,438		64,25	+ 0,29	+ 0,5
	3,148	2,013	1,982		62,96	− 1,00	− 1,6
	4,052	2,592	2,595		64,08	+ 0,12	+ 0,2
	5,160	3,300	3,285		63,66	− 0,30	+ 0,5
Acetanilid	5,196	0,615	0,629	11,84	12,10	+ 0,26	+ 2,2
	8,030	0,951	0,967		12,04	+ 0,20	+ 1,7
	10,129	1,199	1,188		11,73	− 0,11	− 0,9
	15,156	1,794	1,806		11,92	+ 0,08	+ 0,7
	4,063	0,481	0,478		11,76	− 0,08	− 0,7
	7,053	0,835	0,839		11,90	+ 0,06	+ 0,5
	4,921	0,583	0,592		12,03	+ 0,19	+ 1,6
	10,179	1,205	1,220		11,98	+ 0,14	+ 1,2
	15,198	1,799	1,850		12,17	+ 0,33	+ 2,8
	4,130	0,489	0,484		11,72	− 0,12	− 1,0
	5,100	0,604	0,585		11,47	− 0,37	− 3,1
	7,035	0,833	0,854		12,14	+ 0,30	+ 2,5
	9,991	1,183	1,196		11,97	+ 0,13	+ 1,1
	15,114	1,789	1,794		11,87	+ 0,03	+ 0,25

Tabelle (Fortsetzung)

Substanz	Einw. in mg	O in mg		O in Gew.-%		Fehler	
		ber.	gef.	ber.	gef.	abs.	rel.
Sulfanilsäure	4,014	1,112	1,145	27,72	28,52	+ 0,80	+ 2,9
	6,179	1,713	1,728		27,97	+ 0,25	+ 0,9
	8,028	2,225	2,290		28,52	+ 0,80	+ 2,9
	10,030	2,780	2,824		28,15	+ 0,43	+ 1,6
	5,959	1,652	1,631		27,37	− 0,35	− 1,3
	8,067	2,236	2,190		27,15	− 0,57	− 2,1
Palmitinsäurechlorid	9,461	0,551	0,610	5,82	6,45	+ 0,63	+ 10,8
	21,480	1,250	1,386		6,45	+ 0,63	+ 10,8
	14,908	0,868	0,967		6,49	+ 0,67	+ 11,5
	35,593	2,013	1,060		5,95	+ 0,13	+ 2,2

2. Die Verwendung von Wasserstoff als Trägergas hat folgende Vorteile: Der bei der Reaktion entstehende Wasserstoff wird eliminiert. Bei der Verwendung von beispielsweise Argon als Trägergas zeigt sich im

Abb. 6. Ansicht der Gesamtapparatur

Chromatogramm bei der Ausspülung des durch die Methanzersetzung entstandenen Wasserstoffs eine starke Unsymmetrie des Wasserstoffpeaks, die die quantitative Auswertung des darauf folgenden CO-Peaks stark beeinträchtigt (Abb. 7). Der Wasserstoff stammt zum Teil aus der

Zersetzung des beim Vercracken gebildeten Methans. Abb. 8 zeigt die Zersetzung von Methan in Abhängigkeit von der Temperatur.

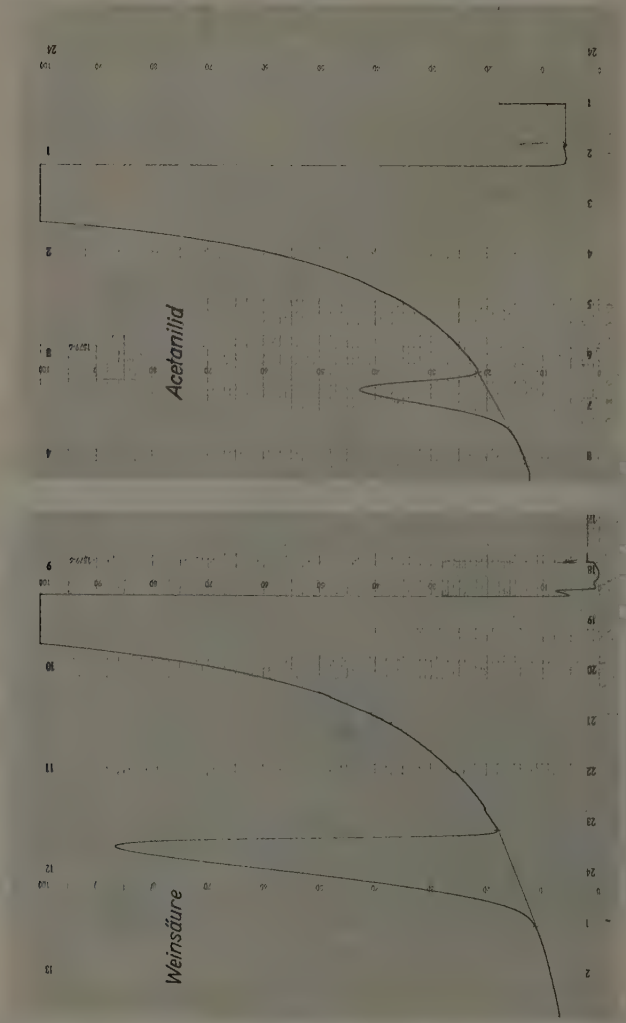


Abb. 7. Chromatogramm bei Verwendung von Argon als Trägergas

3. Die Genauigkeit der Methode ist im individuellen Bereich nur von dem Einwiegenden abhängig. Wägefehler oder Titrationsfehler nach der Verbrennung fallen fort.

4. Blindwerte können nicht auftreten, da der Wasserstoff, der durch die Apparatur geht, zusammen mit dem Wasserstoff im Vergleichskreis

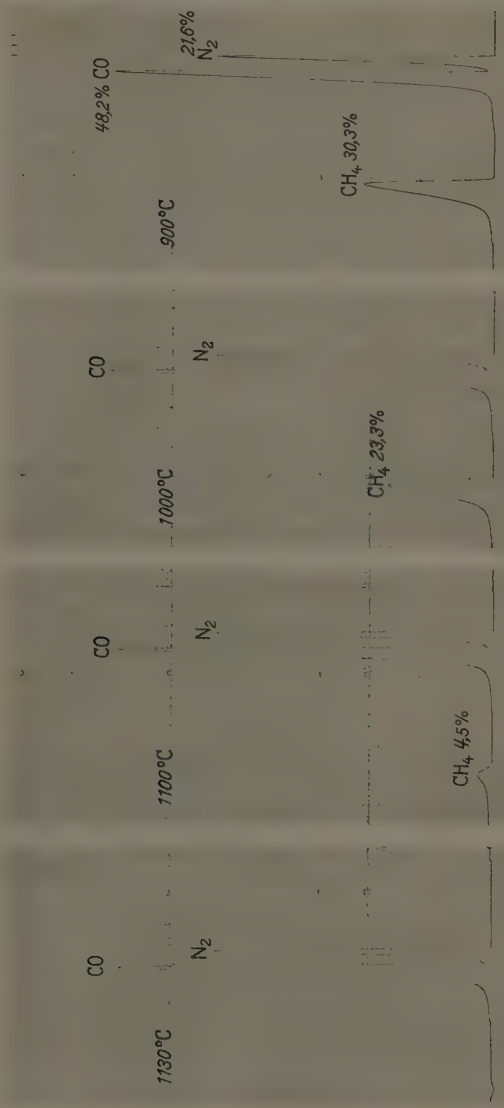


Abb. 8. Zersetzung von Methan in Abhängigkeit von der Temperatur (Trägergas: Wasserstoff; Chromat.-Kolonne: 500 cm A-Kohle)

in der Wärmeleitfähigkeitskammer eine Grundlinie bildet, so daß ein auftretender CO-Peak nur vom Sauerstoff der Substanz stammen kann.

5. Schließlich liefert die Methode eine geschriebene Unterlage der CO-Messung, die noch längere Zeit nach der Bestimmung eingesehen werden kann.

Literatur

[1] Harris, C. C., D. M. Smith u. J. Mitchell jr.: Analyt. Chemistry **22**, 1297 (1950); vgl. diese Z. **134**, 369 (1951/52). — [2] Lindner, J., u. W. Wirth: Ber. dtsch. chem. Ges. **70**, 1025 (1937); vgl. diese Z. **120**, 117 (1940). — [3] Markert, F.: Eine neue Methode z. Bestimmung des Sauerstoffs in org. Körpern, Diss. Dresden 1904. — [4] Schütze, M.: diese Z. **118**, 241, 245 (1939/40). — [5] Ter Meulen, H.: Chem. Weekbl. **19**, 191 (1922); Recueil Trav. chim. Pays-Bas **51**, 509 (1922); vgl. diese Z. **66**, 72 (1925). — [6] Unterzaucher, J.: Ber. dtsch. chem. Ges. **73**, 391 (1940). — [7] Zimmermann, W.: diese Z. **118**, 258 (1939).

Dr. A. Götz, in Fa. Knapsack-Griesheim A.-G., Knapsack bei Köln/Rh.

Farbwerke Hoechst AG vormals Meister Lucius & Brüning Frankfurt/Main-Höchst

Über ein halbautomatisches Titriergerät zur Bestimmung kleiner Mengen Kohlendioxyd

Anwendung für die direkte Sauerstoffbestimmung in organischen Substanzen und für die C- und CO_2-Bestimmung in wäßrigen Lösungen

Von

S. Gorbach und F. Ehrenberger

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 26. Oktober 1960)

Allgemeines

In der vorliegenden Arbeit wird eine verhältnismäßig einfache, halbautomatisch arbeitende Titriervorrichtung beschrieben, mit der kleine Mengen CO_2 potentiometrisch mit Bariumhydroxydlösung als Titrier- und Absorptionsmittel genau bestimmt werden können. Die Apparatur kann insbesondere dort angewendet werden, wo es gilt, kleine CO_2-Gehalte zu ermitteln, so zur mikroanalytischen Bestimmung des Sauerstoffes in organischen Substanzen, zur Bestimmung von CO_2 in starken Laugen und Salzsolen und zur Bestimmung von Spuren C in Abwässern, Mineralsäuren und anderen wäßrigen Lösungen.

Die Grundlage des Verfahrens wurde von W. Oelsen u. G. Graue[3] für die C-Bestimmung in Stahl ausgearbeitet; diese Methode wurde später von F. Ehrenberger, S. Gorbach u. W. Mann[1] zur direkten O-Bestimmung in organischen Substanzen angewendet.

Das Grundsätzliche des Verfahrens ist in den beiden vorgenannten Arbeiten genau beschrieben und wird an dieser Stelle nur kurz wiederholt.

Das während einer Analyse anfallende CO_2 wird in einer auf p_H 11 eingestellten Bariumhydroxydlösung absorbiert. Dabei wird eine äquivalente Menge $Ba(OH)_2$ verbraucht. Gleichzeitig gibt man aus einer Bürette immer soviel $Ba(OH)_2$-Lösung mit bekanntem Gehalt zu, daß ein p_H-Wert von 11 ständig aufrecht erhalten wird. Die insgesamt angewendete Menge $Ba(OH)_2$-Maßlösung dient zur Bestimmung des absorbierten Kohlendioxyds. Zur p_H-Messung wird das vom p_H-Wert abhängige Redoxysystem H_2O_2/OH^- herangezogen. Das Potential stellt sich an einem eingetauchten Pt-Blech schnell und reversibel ein. Als Vergleichselektrode dient die gesätt. Kalomelelektrode. Die Potentialdifferenz dieser Kette beträgt bei p_H 11 0 Volt; die Titration kann mit einem Potentiometer oder unmittelbar mit einem empfindlichen Galvanometer verfolgt werden.

Die erforderliche $Ba(OH)_2$-Lösung wurde bisher von Hand aus einer Bürette hinzugegeben. Für Serienanalysen ist das Verfahren unrationell, da z. B. bei der direkten Sauerstoffbestimmung in organischen Substanzen das CO_2 innerhalb von 5—15 min anfällt und man während des ganzen Zeitraumes das Galvanometer zu beobachten und die Bürette zu bedienen hat.

Als Absorptionszellen wurden bisher vorwiegend Gefäße der aus Abb. 5 (*A*) ersichtlichen Form benutzt, die ausreichend sind, wenn weniger als 200 μg CO_2 pro Minute anfallen. Es zeigte sich aber, daß diese nicht immer geeignet sind, die CO_2-Mengen quantitativ zu absorbieren, die während der direkten Bestimmung des Sauerstoffes in organischen Substanzen anfallen können[1]. Es müssen daher 2 solcher Gefäße hintereinandergeschaltet werden, wenn eine praktisch quantitative Absorption gewährleistet sein soll.

Wir haben daher versucht, die Titration ohne allzu großen Aufwand zu automatisieren und eine zweite Titrationszelle so zu konstruieren, daß mindestens 0,4—0,5 mg CO_2/min ohne Verlust absorbiert werden können. Außerdem sollte die Apparatur als möglichst kompakte Einheit überall dort eingesetzt werden können, wo letztlich CO_2 quantitativ zu bestimmen ist.

Apparatives

Der Aufbau der Apparatur ist in den Abb. 1 und 2 schematisch dargestellt. Darin bedeuten *A* die Absorptionszelle, *V* einen zweistufigen Meßverstärker, *P* einen photoelektrischen Kleinregler mit je einem Maximal- und Minimalkontakt und den dazugehörenden Relais Z_1 und Z_2, *R* einen Widerstand, *M* eine Motorkolbenbürette und *T* eine Drucktaste.

*Die automatische Titriervorrichtung**

Wird durch ankommendes CO_2 im Elektrodenraum der Zelle *A* (Abb. 1 u. 2) $Ba(OH)_2$ verbraucht, dann sinkt der p_H-Wert der Absorptionslösung, und zwischen den Elektroden tritt eine Spannung auf. Diese wird mit dem Meßverstärker** *V* verstärkt und in den photoelektrischen

* Bezugsquelle Fa. Ingold Frankfurt/M., Brönnerstraße.

** Knick-Verstärker Type 2 A.

Kleinregler* P eingegeben. Der Kleinregler besteht aus einem Drehspulengalvanometer, zwei photoelektrischen Lichtschranken, die über die Skala des Galvanometers gegeneinander verschiebbar sind, und zwei Relais mit Ruhe- und Arbeitskontakten (Z_1 und Z_2). Der Galvanometerzeiger, der eine Abdeckfahne trägt, kann sich innerhalb der beiden Lichtschranken frei bewegen, diese jedoch nicht mehr als 2 mV unter- bzw. überschreiten (Arretierung). Erreicht die Spannung und damit der Galvanometerzeiger einen Skalenwert, auf den die erste Lichtschranke eingestellt ist, so wird der Lichtweg geöffnet, der Bürettenmotor M erhält über den Widerstand R und den Arbeitskontakt des

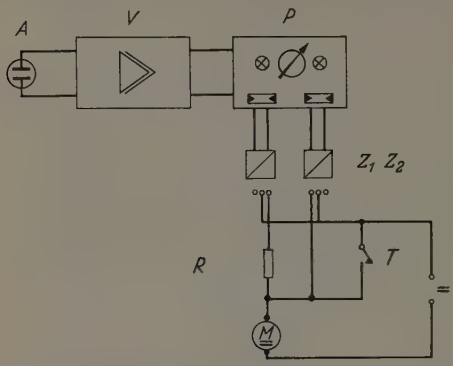


Abb. 1. Blockschaltbild des Titriergerätes. A Absorptionszelle; V Meßverstärker; P Photozellenkleinregler; Z_1, Z_2 Relais; R Widerstand; T Drucktaste; M Motorkolbenbürette

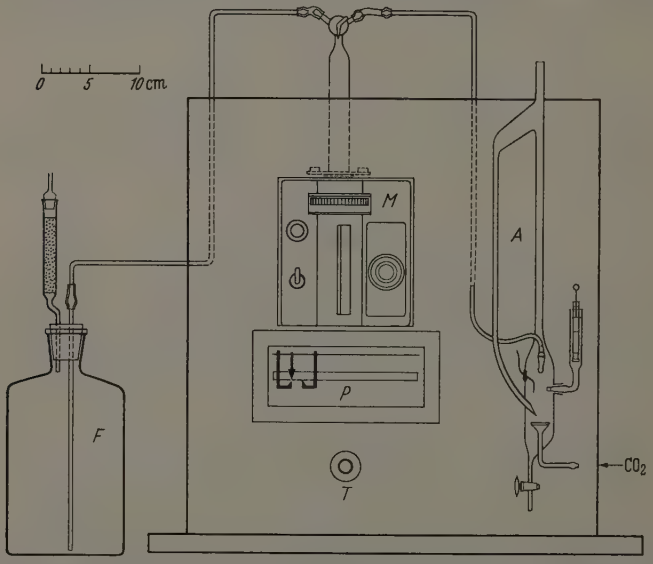


Abb. 2. Frontansicht des Titriergerätes. A Absorptionszelle; P Photozellenkleinregler; M Motorbürette; F Vorratsflasche; T Drucktaste

* Getro Regler Typ Ri 666 W.

Relais Z_1 eine reduzierte Spannung und läuft langsam an. Erreicht die Spannung einen Wert, auf den die zweite Lichtschranke eingestellt ist, wird dort der Lichtweg unterbrochen, das zweite Relais Z_2 fällt ab und schließt über den Ruhestromkontakt den Widerstand R kurz. Der Motor erhält die volle Spannung und läuft nunmehr mit voller Geschwindigkeit.

Über die Drucktaste T kann der Motor unabhängig von der Regelvorrichtung in Betrieb genommen werden.

Als Motorbürette dient ein handelsübliches Gerät, dessen Motorstromkreis über die entsprechenden Relais des Reglers und den Widerstand geführt wird.

Als Kalomelelektrode kann jede käufliche Elektrode mit guter Kapazität verwendet werden, jedoch ist unbedingt darauf zu achten, daß als Diaphragma des Stromschlüssels ein Tonstift dient. Glasfritten und ähnliche Materialien haben sich nicht bewährt.

Die Absorptionszelle (Umlaufzelle)

Für die Konstruktion der Zelle mußten folgende Gesichtspunkte berücksichtigt werden:

Das CO_2 soll in möglichst wenig Absorptionsmittel praktisch quantitativ absorbiert und unmittelbar in der Zelle titriert werden. Der Zelleninhalt soll dabei rasch durchmischt werden. Die in Abb. 3 gezeigte Zelle erfüllt diese Anforderungen.

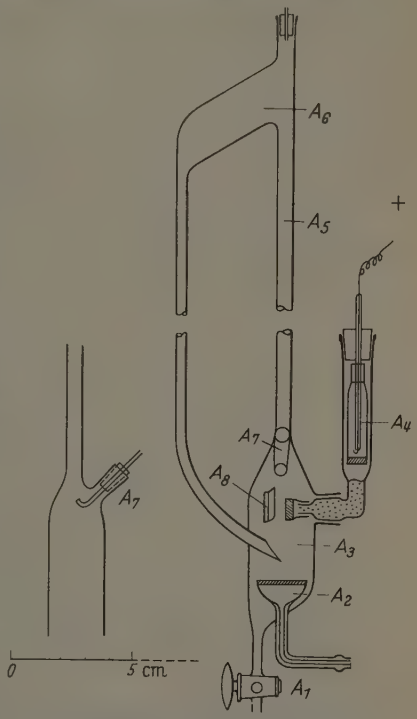


Abb. 3. Die Umlaufzelle. A_1 Ablaßhahn; A_2 Glasfritte G_3; A_3 Elektrodenkammer; A_4 Kalomelelektrode; A_5 Absorptionsrohr; A_6 Entgasungsraum; A_7 Titriermitteleinlauf; A_8 Platinelektrode

Das CO_2-führende Trägergas tritt durch die Fritte A_2 fein zerstäubt in den Elektrodenraum A_3 ein und strömt durch den sich verjüngenden Zylinder A_5 in die Entgasungskammer A_6. Dabei wird gleichzeitig die Absorptionslösung in die Entgasungskammer hochgedrückt und fällt wieder über das Fallrohr in die Elektrodenkammer zurück. Das Titrationsmittel wird in die Elektrodenkammer eindosiert (A_7) und durch den Umpumpvorgang schnell und innig mit der Absorptionsflüssigkeit

vermischt. Die Umlaufzelle faßt etwa 50 ml Absorptionslösung; ihr Inhalt wird in 7—8 sec einmal umgewälzt. Erfahrungsgemäß kann die Umlaufzelle bis zu 0,4 mg CO_2 je Minute quantitativ absorbieren, die Zelle der ursprünglichen Form etwa 0,1—0,2 mg CO_2/min.

Diese Zelle unterscheidet sich von ähnlichen Zellen vornehmlich dadurch, daß das Gas in feinst verteilter Form den Umpumpvorgang bewirkt, ohne sich dabei zu größeren Blasen zu vereinigen.

Ausfallendes $BaCO_3$ sinkt in den Sumpf ab.

Erforderliche Reagentien

Absorptionslösung (Lösung A). 10 g $BaCl_2$ werden in Wasser gelöst, mit 5 ml Äthanol und 0,5 ml 30%iger Wasserstoffperoxydlösung versetzt und mit Wasser auf 1 l aufgefüllt. Diese Lösung braucht weder filtriert noch gegen CO_2 geschützt zu werden.

Titrierlösung (Lösung B). 7,6 g $BaCl_2$ und 2,12 g NaOH p.a. werden in 4 l ausgekochtem, dest. Wasser gelöst und unter Stickstoff als Schutzgas in die Vorratsflasche der Motorbürette filtriert. Die Belüftungsleitung der Flasche ist mit einem Natronkalkröhrchen vor CO_2-Zutritt aus der Luft zu schützen. Der Titer der Lösung wird empirisch ermittelt[1].

Bedienungsvorschrift

Die Absorptionszelle wird mit dem CO_2-Generator (Verbrennungsofen, CO_2-Entwicklungsgefäß usw.) mit einem Gummischlauch verbunden und der Trägergasstrom eingeschaltet. Der Abflußhahn A_1 der Zelle ist geschlossen. Die Absorptionszelle wird erst jetzt mit Lösung *A* bis etwa 0,5 cm unterhalb des Entgasungsraumes A_6 gefüllt. Da die Absorptionslösung zu dieser Zeit einen p_H-Wert von etwa 7 hat, besitzen die beiden Elektroden eine Potentialdifferenz, die bewirkt, daß der Galvanometerzeiger des Kleinreglers *P* über beide Stellmarken (Lichtschranken) hinweg nach rechts wandert. Der Bürettenmotor *M* läuft mit voller Geschwindigkeit an und pumpt Titrierlösung in die Elektrodenkammer der Zelle. Der p_H-Wert der Absorptionslösung steigt langsam an; der Galvanometerzeiger wandert links gegen 0 zurück und schaltet über die Stellmarken die Motorbürette ab. Mit Hilfe der Drucktaste *T* stellt man den Galvanometerzeiger genau auf 0,3 mV ein. Man beachte dabei, daß der Regler nicht sogleich anspricht, wenn man Titrierlösung zupumpt. Nachdem man die Bürette neu gefüllt hat, ist das Titriergerät zur Analyse bereit.

Tritt nun CO_2 in die Absorptionslösung ein, wird $Ba(OH)_2$ verbraucht, wobei Ba-carbonat ausfällt. Der p_H-Wert der Lösung sinkt, und eine Potentialdifferenz tritt auf; der Zeiger des Galvanometers wandert nach rechts und bewirkt, indem er die erste Stellmarke überschreitet, ein langsames Anlaufen des Bürettenmotors. Fällt sehr viel CO_2 an, passiert der Zeiger auch die zweite Stellmarke, der Motor läuft schneller, so daß der größere Verbrauch an $Ba(OH)_2$ durch schnelleren Zufluß von Titriermittel wieder kompensiert wird. Dieser Vorgang wiederholt sich so oft bis kein CO_2 mehr ankommt. Ist die Analyse beendet, wird mit der Drucktaste tropfenweise Titrierlösung zugegeben und genau auf das Ausgangspotential zurücktitriert. Den Verbrauch an Titrierlösung liest man an der Motorbürette ab. Mit der nächsten Analyse kann gleich danach begonnen werden, ohne daß man die Zelle mit neuer Adsorptionslösung füllen muß. Man läßt lediglich soviel der Lösung ab, daß genügend Raum für das nächste Titriermittelvolumen geschaffen wird; dabei wird ausgefallenes $BaCO_3$ selbsttätig aus dem Zellensumpf entfernt.

Es ist vorteilhaft, nach jeder 6.—7. Analyse die Absorptionslösung abzulassen, die Zelle mit dest. Wasser zu spülen und mit frischer Absorptionslösung zu füllen.

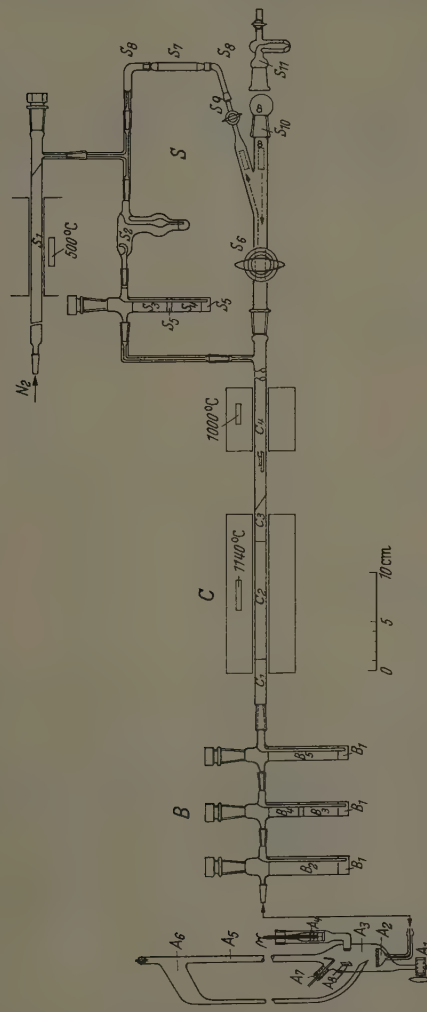


Abb. 4. Apparatur zur direkten Sauerstoffbestimmung in organischen Substanzen. *A* Absorptionszelle; (A_1—A_6 siehe Abb. 3); *B* Reinigungs- und Absorptionsrakt; B_1 Quarzwolle; B_2 Schützekontakt; B_3 Magnesiumperchlorat; B_4 P_2O_5 auf Bimsmehl; B_5 Askarit; *C* Vorrichtung zur Pyrolyse; C_1 Ag-Wolle, C_2 Kohlekontakt; C_3 Quarzgrieß; C_4 Pt-Schiffchen im Nickelboot; *S* Gasreinigungs- und Probeneinschleusvorrichtung; S_1 Kupfer granuliert; S_2 Blasenzähler (konz. H_2SO_4); S_3 P_2O_5 auf Bimsmehl; S_4 Askarit; S_5 Quarzwolle; S_6 Schleusenhahn; S_7 P_2O_5 auf Bimsmehl; S_8 Schlauchverbindungen; S_9 Entlüftungshahn; S_{10} Schliffkappe; S_{11} Blasenzähler (H_2SO_4)

Man beginne die neue Analysenserie mit einer Blindwertbestimmung. Wird die Apparatur abends außer Betrieb gesetzt, so läßt man die Absorptionslösung ab, spült mit dest. Wasser und füllt die Zelle mit gesätt. KCl-Lösung. Die gesamte

Apparatur bleibt dabei auch über Nacht unter Stickstoffdruck. Bei Inbetriebnahme wird die KCl-Lösung abgelassen, mit Wasser gut nachgespült, mit A-Lösung beschickt und wie beschrieben weiterverfahren.

Anwendungen

Die direkte Bestimmung von Sauerstoff in organischen Substanzen

Apparatur und Arbeitsvorschrift sind bereits an anderer Stelle beschrieben worden[1]. Es wurden lediglich die beiden dort angewandten Absorptionszellen durch das hier beschriebene Titriergerät ersetzt. Abb. 4 zeigt schematisch die Apparatur mit der neuerdings benutzten Zelle. Beleganalysen sind in Tab. 1 aufgeführt.

Tabelle 1

Substanz	E mg	n	% O ber.	% O * gef.	d	s	Bemerkung
Acetanilid	4—5	9	11,84	—	—	0,06	Der daraus ermittelte Wirkwert der Titrierlösung ist 154 μg O/ml
Benzoesäure	3—4	3	26,20	26,18	—0,02	—	
Acetylsalicylsäure	2—3	2	35,52	35,47	—0,05	—	
Weinsäure	1—1,5	10	63,96	63,67	—0,29	± 0,11	

n Anzahl der ausgeführten Analysen.
d Abweichung des gefundenen Wertes vom berechneten.
s Standardabweichung[2].
* Mittelwert.

Die Bestimmung von Spuren Kohlenstoff in wäßrigen Lösungen

Zur Bestimmung von Spuren Kohlenstoff in wäßrigen Lösungen hat sich die in Abb. 5 dargestellte Apparatur in Verbindung mit dem Titrierautomaten bewährt. Da während dieser Analysen nur sehr geringe CO_2-Mengen ($< 1—2$ mg CO_2 insgesamt) zu erwarten sind, verwendet man vorzugsweise eine Absorptionszelle der in Abb. 5 abgebildeten Form (A). Sie reicht zur Absorption der geringen CO_2-Mengen aus, benötigt weniger Absorptionsflüssigkeit und ist dadurch empfindlicher. Für CO_2-Mengen zwischen 1—5 mg muß die Umlaufzelle verwendet werden.

Arbeitsvorschrift. Zu Beginn der Analyse bringt man den Hahn A_9 in Stellung I und regelt den Sauerstoffstrom auf etwa 10 ml/min. Danach füllt man die Absorptionszelle mit Lösung A, setzt die Titrationsapparatur in Gang und stellt genau auf 0,3 mV ein.

100—200 mg der wäßrigen Lösung werden in ein Pt- oder Quarzschiffchen eingewogen, einige Milligramme $K_2S_2O_7$ zugesetzt und unmittelbar darauf in das Verbrennungsrohr eingeschoben. Man verdampft zuerst vorsichtig die wäßrige

Lösung und erhitzt den Abdampfrückstand mit dem Bunsenbrenner einige Minuten auf etwa 500—600° C. Wasserdampf und Verbrennungsgase streichen über einen auf 900° C erhitzten Kupferoxydkontakt (C_2) (Abb. 5). Das aus dem vorhandenen Kohlenstoff entstehende CO_2 wird von S- und Cl-haltigen Beimengungen mit Ag-Wolle bei 450° C (C_1) und von Stickoxyden mit konz. ausgekochter Schwefelsäure (S_4) befreit, in der Absorptionszelle A absorbiert und titriert. Ist viel Stickoxyd zu erwarten, wird ein zweiter H_2SO_4-Wäscher erforderlich.

Nach beendeter Analyse dreht man den Dreiweghahn A_3 in Stellung II und entfernt dann erst das Schiffchen aus dem Verbrennungsrohr, andernfalls sickert die Absorptionslösung durch die Fritte A_2. Ein fehlerhaftes Resultat der nächsten Analyse wäre die Folge.

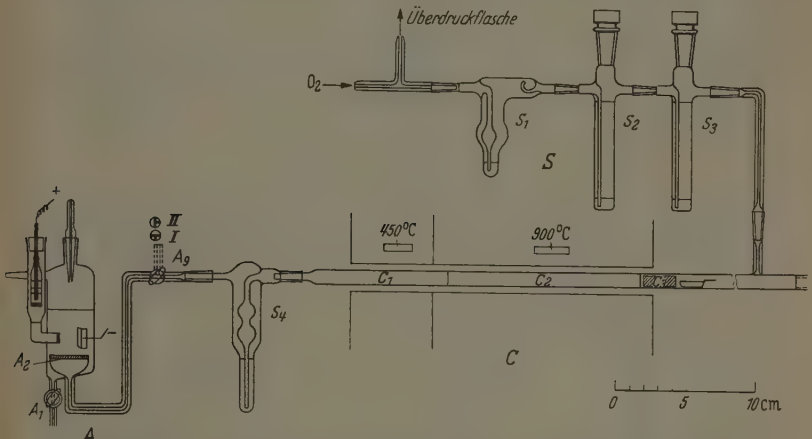


Abb. 5. Die Bestimmung von Spuren C in Abwässern. S_1, S_4 Blasenzähler (konz. H_2SO_4); S_2 Gasreinigungsröhrchen (J_2O_5); S_3 Gasreinigungsröhrchen (Askarit); C_1 Silberwolle; C_2 Kupferoxyd; C_3 Pt-Drahtnetz; A Meßzelle (siehe Abb. 6)

Nach diesem Verfahren gelingt es, selbst in starken Mineralsäuren eine genaue C-Bestimmung durchzuführen.

Der Wirkwert der Meßlösung wurde mit verdünnter Weinsäurelösung ermittelt.

Beleganalysen und Analysenbeispiele zeigt Tab. 2.

Die Bestimmung des Carbonatgehaltes starker Laugen, Kochsalzsolen und anderer wäßriger Lösungen

Für die Bestimmung des Carbonatgehaltes eignet sich die in Abb. 6 gezeigte Apparatur in Verbindung mit dem Titriergerät und der Absorptionszelle der ursprünglichen Form ($CO_2 < 1{,}0$ mg) oder Umlaufzelle ($1{,}0 < CO_2 < 5$ mg).

Arbeitsvorschrift. 1—2 g Substanz werden in das Reaktionskölbchen eingewogen und etwa 6 ml ausgekochtes, dest. Wasser dazugegeben. Man verbindet das Kölb-

Tabelle 2

Substanz	Einwaage mg	% C ber.	% C gef.
Weinsäure in Wasser	150,7	0,160	$0,16_1$
	161,0	0,160	$0,15_6$
Aceton in Wasser	158,6	0,054	$0,05_2$
	165,6	0,054	$0,05_2$
Leitungswasser	143,8		$0,01_3$
	208,6		$0,01_7$
Abwasser I	51,2		$0,16_2$
	147,2		$0,16_7$
Abwasser II	149,0		$0,10_9$
	157,4		$0,11_2$
Abwasser III	188,6		$0,12_1$
	118,2		$0,11_7$

chen mit dem Rückflußkühler E_4, dichtet den Schliff mit einem Tropfen konz. Schwefelsäure und sichert es mit Federn. Die Säurebürette E_3 wird mit verd. Schwefelsäure (1:1) gefüllt und die Hähne E_6 und A_9 in Stellung *I* gebracht. Man

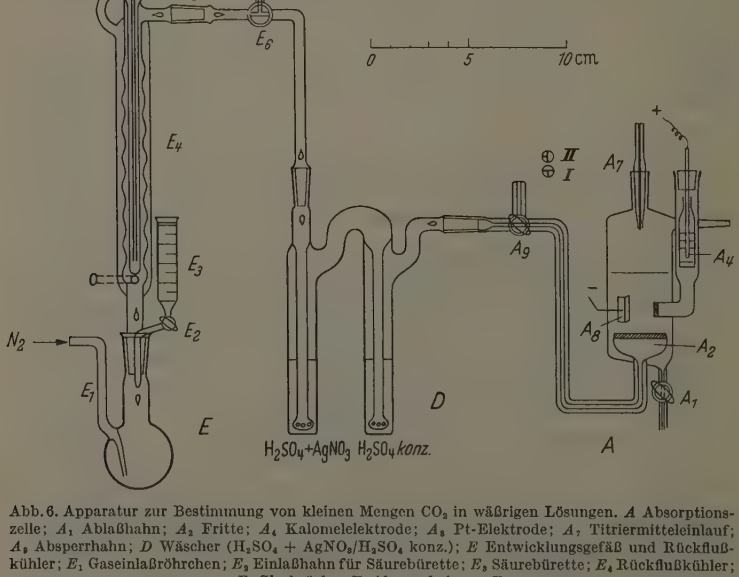


Abb. 6. Apparatur zur Bestimmung von kleinen Mengen CO_2 in wäßrigen Lösungen. *A* Absorptionszelle; A_1 Ablaßhahn; A_2 Fritte; A_4 Kalomelelektrode; A_8 Pt-Elektrode; A_7 Titriermitteleinlauf; A_9 Absperrhahn; *D* Wäscher (H_2SO_4 + $AgNO_3/H_2SO_4$ konz.); *E* Entwicklungsgefäß und Rückflußkühler; E_1 Gaseinlaßröhrchen; E_2 Einlaßhahn für Säurebürette; E_3 Säurebürette; E_4 Rückflußkühler; E_5 Glasbrücke; E_6 Absperrhahn zu E_3

läßt nun gereinigten Stickstoff durch die Apparatur strömen, füllt die Absorptionszelle mit Lösung A und setzt das Titriergerät in Betrieb. Es soll solange mit Stickstoff gespült werden, bis das eingestellte Anfangspotential 0,3 mV während 3 bis 4 min unverändert bleibt. Die Apparatur ist sodann blindwertfrei. Man stellt nun zuerst Hahn A_9 und danach Hahn E_6 in Stellung *II* und läßt aus E_3 2 ml der verd. Schwefelsäure zufließen. Sogleich werden die beiden Hähne — und zwar diesmal zuerst Hahn E_6 — in Stellung *I* zurückgebracht und das Kölbchen mit siedendem Wasser erwärmt. Das sich bildende CO_2 wird vom Trägergas in die Absorptionszelle gespült und dort titriert.

Zur Bestimmung des CO_2-Gehaltes von gesätt. Kochsalzsolen werden 1—10 g eingewogen, mit 1 ml Schwefelsäure (1:1) angesäuert und das CO_2 unter schwachem Erwärmen auf 50—60° C im Stickstoffstrom ausgetrieben.

Analysenbeispiele. Der Wirkwert der Titrierlösung wurde mit verdünnter Na_2CO_3-Lösung ermittelt (51,04 mg Na_2CO_3/100 ml bidest. Wasser); das Mittel aus vier Bestimmungen ergab, daß 1 ml Titrierlösung 0,290 mg C entsprach. Beispiele sind in Tab. 3 angegeben.

Tabelle 3

Substanz	Einwaage in g	% C ber.	% C gef.
gesätt. Kochsalzlösung ausgekocht	4,7	—	$<0{,}002$
gesätt. Kochsalzlösung ausgekocht + Na_2CO_3-Testlösung	9,7	0,003	$0{,}003_1$
Leitungswasser	10		$0{,}005_8$
	5		$0{,}005_8$
50%ige KOH-Lösung	2,89		0,033
	2,89		0,036
46%ige Lauge aus Chlor-Alkali Elektrolyse	12,2		$0{,}004_3$
	11,5		$0{,}004_7$
Reinsole aus Chlor-Alkali-Elektrolyse	3,6		$0{,}004_2$
	3,6		$0{,}004_3$
Permutitwasser aus Chlor-Alkali-Elektrolyse	10		$0{,}004_4$
	10		$0{,}004_4$
Amalgam aus Chlor-Alkali-Elektrolyse	372		0,00005

Zusammenfassung

Es wird ein halbautomatisches Titriergerät beschrieben, mit dem kleine Mengen CO_2 (0,015—5 mg) potentiometrisch mit $Ba(OH)_2$ als Titrier- und Absorptionsmittel bestimmt werden können. Es wird gezeigt, wie die Apparatur zur direkten Bestimmung des Sauerstoffs in organischen Substanzen nach Schütze und Zimmermann und zur Bestimmung von Spuren von gebundenem und freiem CO_2 sowie gebundenem C in wäßrigen Lösungen eingesetzt werden kann. Die Resultate einiger Analysenbeispiele sind angegeben.

Literatur

[1] Ehrenberger, F., S. Gorbach u. W. Mann: Mikrochim. Acta (Wien) **1958**, 778; vgl. diese Z. **170**, 450 (1959). — [2] Kaiser, H., u. H. Specker: diese Z. **149**, 46 (1956). — [3] Oelsen, W., u. G. Graue: Angew. Chem. **64**, 24 (1952); vgl. diese Z. **140**, 282 (1953). — Oelsen, W., H. Haase u. G. Graue: Arch. Eisenhüttenwes. **22**, 225 (1951).

Dr. S. Gorbach,
Farbwerke Hoechst AG., Frankfurt/Main-Höchst, Analytisches Laboratorium

---

Aus dem Institut für anorganische Chemie der Universität Wien

Die besten Möglichkeiten zur Fluorbestimmung organischer Verbindungen

Von
H. Ballczo

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 26. Oktober 1960)

Zufolge der großen Bindefestigkeit organischer Fluorverbindungen gehört die analytische Erfassung des Fluors in ihnen zu den schwierigsten Aufgaben der Elementaranalyse organischer Verbindungen. Nur in den seltensten Fällen gelingt es, bei der Verbrennung im Sauerstoffstrom organische Substanzen soweit zu zersetzen, daß auch das Fluor in einfacher Weise zur Bestimmung gelangen kann. Meist sind dazu viel höhere Verbrennungstemperaturen (900—1150° C)[16] und auch andere Versuchsbedingungen, so vor allem ein anderes Rohrmaterial (Quarz, Platin), erforderlich. Solcherart bedarf es eigener Methoden, um das Fluor in den organischen Verbindungen zu mineralisieren oder besser löslich zu machen. Grundsätzlich muß man dabei drei Schritte unterscheiden: den Aufschluß der organischen Substanz, die Beseitigung der störenden Begleitionen und die Bestimmung des Fluorions.

1. Aufschlußverfahren

Das alte klassische Aufschlußverfahren mit Calciumoxid[13] im geschlossenen Rohr bringt vielfach keine quantitative Zersetzung, ist jedoch in allen jenen Fällen zu empfehlen, wo das Fluor nicht direkt in der organischen Verbindung sondern nur mit ihr anorganisch mineralisiert ist (wie etwa in den Pflanzenaschen, Zähnen, Knochen und ähnlichem Probenmaterial[4,24,25]. Durch Anwendung sehr energisch wirkender Oxydations- wie Reduktionsmittel gelangt man jedoch viel leichter zu einer quantitativen Fluorausbeute. Schon zu Beginn des Jahrhunderts lehrte Pringsheim[45] den Aufschluß mit Natriumperoxid in einem kleinen

Stahlgefäß, das er bald verschraubte und elektrisch zündete. Besonders in Amerika hat sich diese Methode durch PARR[44] weiter vervollkommnet und durchgesetzt. Aber erst 1933 hat BEAMISH[7] die Bombe aus Nickel hergestellt. Zusatzmittel wie Kaliumnitrat, Rohrzucker sowie andere Oxydationsbeschleuniger (Zündmittel) und ein inniges Vermischen des Probengutes mit dem Aufschlußmittel sind die Voraussetzungen für eine quantitative Umsetzung. Auch betrugen die Aufschlußzeiten bis zu 20 min für Makroeinwaagen, wobei durch das lange Erhitzen die Proben oft ausgeblasen wurden (etwa 3% aller Bestimmungen). WURZSCHMITT[59] hat nun diese an sich gute Methode durch Verwendung eines flüssigen Zündmittels, dem Äthylenglykol, sowie Neukonstruktion des Aufschlußgefäßes (Universalbombe) zu einer ausgezeichneten Universalmethode gemacht (Abb. 1). Schon bei 56°C wird die Bombe gezündet; die Probe braucht nicht vermischt und auch flüssige Proben können eingebracht werden. Die entwickelte hohe Temperatur garantiert eine vollkommene Verbrennung in nur 1 min für den Makro- sowie Mikrobereich. Bei dieser kurzen Aufschlußzeit gibt es kein Ausblasen. Die Bombe ist absolut dicht.

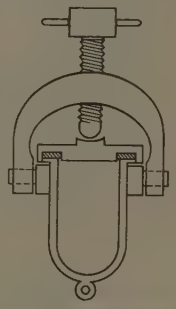


Abb. 1. Universalbombe nach WURZSCHMITT

Vielfach findet man auch den Alkaliaufschluß[27,31,32,34,47,52], so vor allem mit Natriummetall[8,9,40], in der Literatur empfohlen. Doch wird zum vollständigen Makroaufschluß sowohl im geschlossenen Bombenrohr, wie es ELVING u. LIGETT[21] verwendet als auch in der mannigfach verbesserten „Parrbombe" meist eine Zeit von 1—2 Std Erhitzung[27,32] auf 600—700°C benötigt. BELCHER[11] macht bereits auf die oft notwendige bessere Aufschlußwirkung des Kaliums aufmerksam, erhitzt aber auch noch 3—5 mg Substanz mit 30—40 mg Natriummetall[8] 1 Std bei 600°C in der Nickelbombe, um seine Substanzen quantitativ zu mineralisieren, was SAVČENKO[47] bezweifelt und Mindesttemperaturen von über 900°C zum Vorschlag bringt. Trotzdem gelang es KAINZ[31] durch richtige Ausführung den ausgezeichneten Kaliumaufschluß in viel kürzerer Zeit auch quantitativ zu erhalten. 3—4 mg Substanz werden mit mindestens dem 10fachen Überschuß an metallischem Kalium (50—60 mg) in einem zugeschmolzenen Glasröhrchen (nach BÜRGER[15], ZIMMERMANN[60]) in 3 min aufgeschlossen. Durch die Kleinheit des Aufschlußraumes (Abb. 2) sowie die vorherige Verteilung des Kaliums durch vorsichtiges Schmelzen wird dieser rasche und quantitative Aufschluß ermöglicht. Daneben gibt es auch Methoden, die vorzüglich Natrium aber auch Lithium in Lösung oder Suspension auf die organische Substanz einwirken lassen. VAUGHN u. NIEUWLAND[54] verwendeten schon 1931 zur Halb-

mikrobestimmung des Fluors in organischen Substanzen eine Lösung von Natrium in flüssigem Ammoniak. Benett u. Debbrecht[12] berichteten in letzter Zeit über die Verwendung des Natriumbiphenyls in Äthylenglykoldimethyläther zur Reduktion fluorhaltiger Substanzen. Die Zersetzung soll in wenigen Minuten vollständig sein. Doch ist wegen der geringen Aggressivität solcher Verfahren deren Universalität in Zweifel zu setzen.

Für gasförmige und leicht flüchtige Proben wird hingegen die Verbrennung im geschlossenen Rohr im Sauerstoffstrom, so wie es in letzter Zeit Mázor[41] mit erstaunlichem Erfolg versucht hat, oder wieder universeller, weil aggressiver in seiner Wirkung, in der Knallgasflamme, so wie Wickbold[56] und später Ehrenberger[20] zeigten, vorgenommen (Abb. 3). Letzteres Verfahren ist methodisch so vervollkommnet, daß es

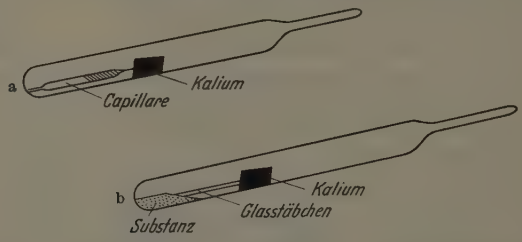


Abb. 2. Reaktionsröhrchen. a für Flüssigkeiten; b für feste Substanzen

die Verbrennung von 12 Proben in der Stunde zu bewältigen imstande ist. Mázor[41] oxydiert mit Mennige am Platinkontakt bei 550—570° C und kann gleichzeitig Kohlenstoff und Wasserstoff bestimmen. Das Fluor wird als Bleichlorfluorid gefällt und maßanalytisch mit 0,002 n Silbernitratlösung gegen Variaminblauacetat bestimmt. Die von Schöniger[48] gefundene und ausgezeichnete, weil sehr einfache und rasche direkte Verbrennung der organischen Substanz im mit reinstem Sauerstoff gefüllten Erlenmeyer-Kolben zur Schnellbestimmung der Halogene wird 1956 von ihm auch für die fluorhaltigen Substanzen erprobt[49] und empfohlen — sicherlich ein sehr gutes und brauchbares Halbmikroverfahren für einfache Substanzen (ohne störende Begleitelemente). Sonst noch in der Literatur anzutreffende Methoden, wie das Erhitzen mit Schwefelsäure, Perchlorsäure, Silberperchlorat und Kaliummetaperjodat oder mit Kieselsäure und Schwefelsäure sind nicht zu empfehlen, da sie nicht immer quantitative Ausbeuten an anorganischen Fluorverbindungen ergeben. So ist der Naßaufschluß mit Schwefelsäure nur auf jene tertiären Fluorverbindungen beschränkt, die beim Erhitzen in sauren Lösungen Fluorwasserstoff abgeben. Dagegen werden jedoch vom metallischen

Kalium (ebenso wie durch die Knallgasflamme) alle aliphatischen, aromatischen sowie auch hochfluorierten festen, flüssigen und gasförmigen organischen Fluorverbindungen quantitativ aufgeschlossen.

Zur Beurteilung dieser vielen, zum Teil recht guten Methoden, kann man nun die verschiedensten Gesichtspunkte erwählen. Vom rein wissenschaftlichen Standpunkt aus werden alle jene Methoden zu empfehlen sein, die eine möglichst vollständige Zersetzung der organischen Substanzen und damit eine quantitative Erfassung ihres Fluorgehaltes gewährleisten. Hierher gehören natürlich alle „robusten Methoden", die entweder durch sehr hohe Temperaturen oder durch sehr aggressive

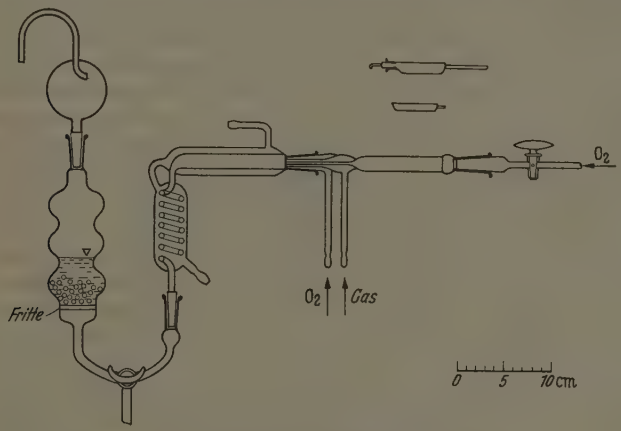


Abb. 3. Quarzapparatur zur Halogenbestimmung

Aufschlußmittel ausgezeichnet sind. Der Praktiker in Industrie und Technik jedoch verlangt überdies von diesen Methoden auch ihre Rentabilität, d.h. aber, sie müssen rasch durchführbar sein. Die Kosten für Reagentien und Apparaturen spielen in der Industrie eine weit untergeordnetere Rolle, da sie der Amortisation unterworfen sind. Bekanntlich entfallen $^3/_4$ der Betiebskosten eines analytischen Industrielabors auf die Arbeitszeit.

Solcherart wird man grundsätzlich den Mikromethoden den Vorzug geben müssen. Bei ihnen wird Arbeitszeit gespart. Apparativ stellen sie oft recht hohe Ansprüche. Betrachtet man nun die obengenannten Methoden noch von einem dritten Standpunkt, nämlich vom Aggregatzustand der zu untersuchenden Proben, so kann man unter Einbeziehung der beiden ersten Gesichtspunkte für feste und flüssige Proben den Kaliumaufschluß nach KAINZ[31] mit einem Substanzverbrauch von 5—10 mg und einem Zeitaufwand von nur wenigen Minuten sicherlich

bestens empfehlen. Handelt es sich aber um leicht flüchtige, flüssige oder gar gasförmige Substanzen, so ist die Verbrennung im Quarzrohr in der Wasserstoff- oder Leuchtgasflamme, wie sie Wickbold[56] und Ehrenberger[20] durchführen, nicht mehr zu umgehen; doch können auch feste und weniger gut flüchtige Substanzen mit dieser sehr universellen, wenn auch in ihrer Anschaffung sehr teuren (Quarzapparatur) Methode aufgeschlossen werden.

Die Knallgasflamme garantiert neben dem quantitativen auch den raschen Aufschluß der Substanz. Für feste und flüssige Substanzen ist gleich nach dem Kaliumaufschluß das Verfahren mit Natriumperoxid in der Wurzschmittbombe mit Zündung durch Äthylenglykol zu empfehlen. Das Äthylenglykol sichert eine sehr rasche und quantitative Verbrennung der Substanzen. Alle anderen in der Bombe ausgeführten Aufschlußverfahren sind durch ihren wesentlich größeren Zeitbedarf unterschieden und daher weniger empfehlenswert. Der Peroxidaufschluß muß jedoch deshalb an zweiter Stelle genannt werden, weil er verschiedene Schwierigkeiten in sich birgt, die beim Kaliumaufschluß im geschlossenen Rohr völlig wegfallen. So ist besonders beim Verwenden ohne Zündmittel die Schwierigkeit der Dosierung des Aufschlußmittels gegeben. Dazu kommt die Gefahr der Substanzverluste bei längerem Erhitzen. Auch sind die Reaktionsprodukte nicht immer leicht und quantitativ aus dem Bombenraum zu entfernen. Das Glasröhrchen kann hingegen nach dem vorsichtigen Öffnen und Ausspülen direkt in den Destillationskolben zum Abtrennen der Fluorionen von den störenden Begleitionen gebracht werden. Für einfache feste und flüssige Substanzen wird sicher auch Schöniger mit seiner einfachen Kolbenmethode und Mázor durch seine katalytische Verbrennung mit Mennige zum Ziele führen und zu empfehlen sein.

2. Beseitigung der störenden Begleitionen

Zur weiteren Erfassung der so aufgeschlossenen organischen Fluorverbindungen muß man, ehe man an eine Endbestimmung schreiten kann, noch die störenden Begleitionen abtrennen. Danach kann man indirekte und direkte Methoden zur Bestimmung der Fluorionen unterscheiden, je nachdem, ob man diese vorher abtrennt, oder es vorzieht, ohne Abtrennung der betreffenden Störelemente, die Fluorbestimmung durchzuführen. Nur in jenen Fällen, bei denen die organischen Fluorverbindungen außer Wasserstoff und Kohlenstoff (sowie Natrium und Schwefel) keine anderen Elemente enthalten, ist die Störung bei Anwendung kleiner Einwaagen gering und kann vernachläßigt werden (Kainz[31]: so z. B. Cyanide, Sulfide und Kaliumsalze, Vorzug der Mikroausführung!). Bei Aufschluß mit Alkalimetall oder Natriumperoxid können die Alkaliionen durch Kationenaustauscher[19] beseitigt werden.

Halogenhaltige Substanzen werden durch Bildung thermostabiler Verbindungen oder nachher durch Ausfällung mit geeigneten Reagentien abgetrennt. So beseitigt Belcher Phosphate und Arseniate durch vorherige Ausfällung mit Zinkcarbonat[9] bzw. Zinkoxid[10]; Schwefel kann mit Vorteil als Bleisulfat mit dem Bleichlorfluorid ausgefällt werden, wenn man die volumetrische Bestimmung bevorzugt[41].

Eine Verflüchtigung der störenden Anionen, etwa wie der Blausäure oder der Kohlensäure[49], durch Ansäuern oder Aufkochen kann nicht empfohlen werden, da dadurch die Gefahr von nennenswerten Fluorverlusten gegeben erscheint. Die wichtigste und auch wirksamste Abtrennung von den anderen Begleitionen ist immer noch die Wasserdampfdestillation, wie sie in ihrem Grundprinzip Willard u. Winter[58] schon 1933 beschrieben haben. Freilich ist auch damit noch keine absolute Abtrennung erfolgt. Man muß vielmehr, um die leichtflüchtigen Halogenwasserstoffsäuren abzubinden, dem Destillationsgut Silbersulfat zusetzen. Reste von Kohlenstoff können bei Verwendung von Perchlorsäure, die übrigens gegenüber der Schwefelsäure und anderen Säuren vorzuziehen ist, durch Reduktion (unverbrannter Kohlenstoff) zum Auftreten von freiem Chlor führen, das durch Einfügen einer Silberspirale[3] leicht zurückgehalten werden kann. Im übrigen ist die Meinung irrig, daß Silbersulfat imstande ist, im perchlorsauren Destillationsgut auch Schwefelwasserstoff quantitativ zurückzuhalten. Der frei gewordene Schwefelwasserstoff wird hingegen durch die in den Destillationsgang eingefügte Silberspirale ebenfalls wirksam abgebunden[3]. Die Silberspirale kann nach dem Schwarzwerden bzw. der Verunreinigung durch Silberchlorid durch Eintauchen in konz. Salzsäure und nachfolgendes Spülen mit konz. Ammoniak und dest. Wasser für weitere Verunreinigungen wieder aufnahmebereit gemacht werden[3]. Von den vielen Ausführungen der Destillation hat sich für die Makro- und Halbmikroausführung die von Huckabay[30] vorgeschlagene und von Ballczo u. Mitarb.[3] verbesserte Form der Destillationsapparatur bestens bewährt (Abb. 4). Dabei sind als wesentliche Verbesserungen die Konstanthaltung der Temperatur des Destillationsgutes durch ein Wärmebad, die Möglichkeit der automatischen Entleerung durch eine Rücksaugvorrichtung R, sowie die stete Destillationsbereitschaft durch eine bequeme Möglichkeit der Probeneinfüllung hervorzuheben. Wie Dahle[17] durch Bestimmung der Fluorausbeuten bei der Destillation nachweisen konnte, liegt die optimale Temperatur für die Destillation der Fluorwasserstoffsäure bei Anwesenheit von Wasserdampf bei 138—140° C, so daß, ein Temperaturgefälle miteingerechnet, als Badflüssigkeit Essigsäureisoamylester, mit einem Siedepunkt von 142° C, zur Erhitzung des Probengutes empfohlen werden kann. Die Apparatur besteht aus Jenaerglas, das unter diesen Bedingungen nicht angegriffen wird. Der Nachteil der

langen Destillationszeit (0,5—1,5 Std) sowie das notwendige Eindampfen des Destillates vor Bestimmung der Fluorionen können durch Verwendung einer neuen Destillationsapparatur[2] (Abb. 5) ohne Destillat noch behoben werden, wenn man aus dem Wasserdampf-Fluorwasserstoffgemisch bei den Temperaturen der Destillation (140° C) in einem eigenen

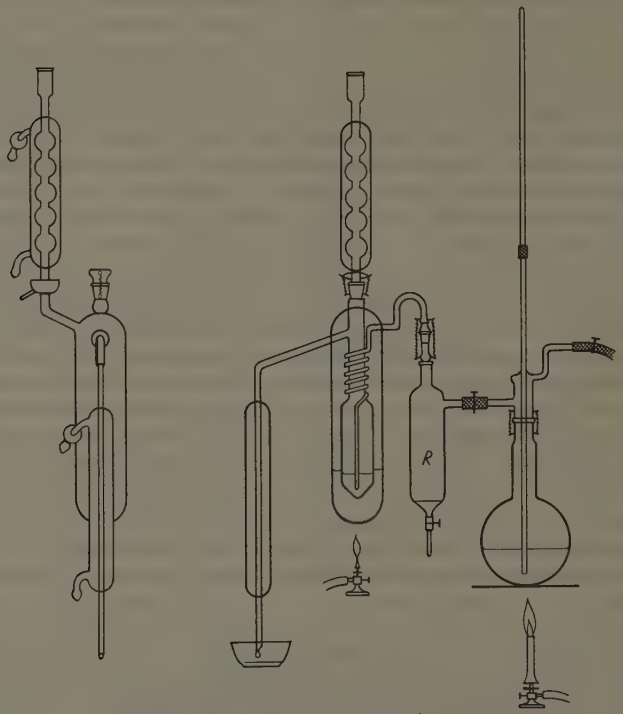


Abb. 4. Destillationsapparatur nach Ballczo u. Kaufmann

Intensivabsorber nur den Fluorwasserstoff zurückhält. Bei diesen hohen Temperaturen wird in der Absorptionsflüssigkeit praktisch kein Wasserdampf kondensiert, so daß man bei Einhaltung einer genügend großen Dampfstromgeschwindigkeit in maximal 15 min sämtliches Fluor in etwa 10 ml Absorptionsflüssigkeit überführen kann. Die in Abb. 6 gezeigte Konstruktion des Absorptionsgefäßes, das auf dem Prinzip einer verkehrten Wasserstrahlpumpe aufgebaut ist, gestattet eine, von der Destillationsgeschwindigkeit unabhängige, quantitative Absorption des zu bestimmenden Fluorwasserstoffgases. Auch wird bei dieser neuen

Durchführungsform durch Einhaltung der richtigen Säurekonzentration (vgl. Siedediagramm Abb. 7) die vorgeschriebene Temperatur des Probengutes im Destillationskolben gewährleistet. Nur eine 53,6%ige Perchlorsäure siedet bei 140°C unter Abgabe von Wasserdampf, der jedoch in diesem Fall dauernd ersetzt wird, wodurch erst ein konstantes

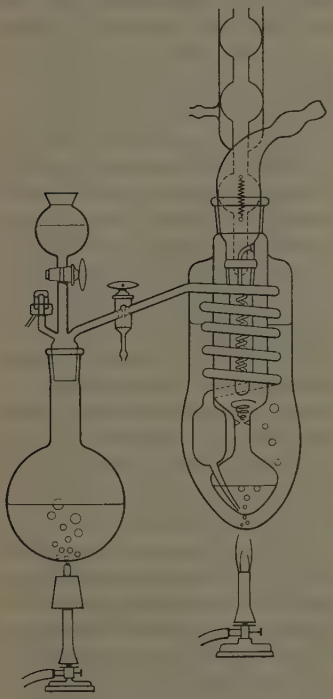
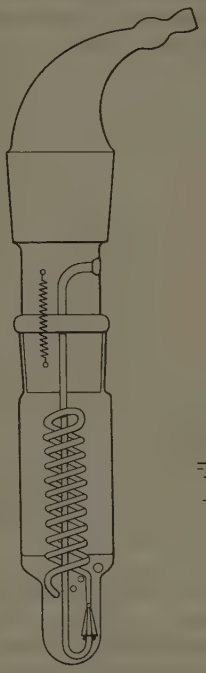


Abb. 5



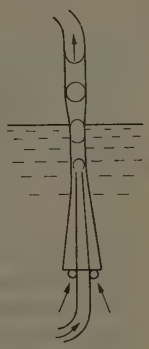


Abb. 6

Abb. 5. Destillationsapparatur nach Ballczo, Doppler u. Lanik
Abb. 6 Absorptionsgefäß

Sieden ermöglicht wird. Die sonst empfohlene Einbringung von Kieselsäure bzw. von Ferrosilicium zum Destillationsgut hat sich als nicht notwendig erwiesen.

3. Bestimmung des Fluorions

Von den vielen Möglichkeiten, das Fluorion gravimetrisch, colorimetrisch und maßanalytisch zu bestimmen, seien nur die wirklich brauchbaren und besten Methoden herausgegriffen; ansonst sei auf die zahlreichen Zusammenfassungen in der Literatur verwiesen[3,38,39,50]. Von

den ursprünglichen Methoden der Fällung als Calciumfluorid und als Bleichlorfluorid[26,35,36,46] ist heute praktisch nur die letzte noch erwähnenswert, da sie die Möglichkeit sowohl ihrer gravimetrischen als auch maßanalytischen Bestimmung bietet. Ihre verhältnismäßig große Löslichkeit gestattet keine quantitative Erfassung der zu bestimmenden Fluorionen, ist aber überall dort, wo es gilt, Fluorwasserstoff aus der Gasphase festzuhalten, wie es Mázor[41] in seiner ausgezeichneten Arbeit über die gleichzeitige Bestimmung von Kohlenstoff, Wasserstoff und Fluor im geschlossenen Rohr versucht hat, bestens zu empfehlen. Mennige wird hierbei nicht nur als Oxydationsmittel für die Verbrennung des organisch gebundenen Kohlenstoffes und Wasserstoffes verwendet, sondern hält gleichzeitig alles Fluor quantitativ zurück. Übrigens gelingt es dem Verfasser, die Löslichkeit des gebildeten Bleichlorfluorides unter Zugabe entsprechender Mengen von Natriumchlorid so weit herunterzudrücken, daß noch 50 μg Fluor in 10 ml Lösung mit einem Fehler von 2% gefällt werden können. Die Auswaage ist jedoch so klein, daß man auch hier der genaueren maßanalytischen Bestimmung den Vorzug gibt. So haben Erdey u. Mitarb.[23] durch Auflösen des Niederschlages in Äthylendiamintetraacetat und nachheriger argentometrischen Bestimmung des stöchiometrisch entsprechenden Chloridgehaltes bei einem p_H 3,6 und der Verwendung von Variaminblauacetat als Redoxindicator das Fluor mit großer Genauigkeit bestimmt. Das sehr schwer lösliche Triphenylzinnfluorid[1] wurde zur gravimetrischen Fluorbestimmung empfohlen. Die Nachteile des ebenfalls schwerlöslichen Reagenses, des Triphenylzinnchlorids, werden zum Vorteil, wenn man seine Lösung in Chloroform unter kräftigem Rühren mit der wäßrigen Phase, welche das Fluorion gelöst enthält, in innigen Kontakt bringt und so das gesamte Fluor an der Trennschicht beider Phasen zur Ausfällung bringt (Zweiphasenfällung[6]). Solcherart kann das Fluor auch neben Phosphat und Borat quantitativ gefällt werden; das Triphenylzinnphosphat und -borat sind chloroformlöslich und werden so in Lösung gehalten. Das Triphenylzinnfluorid ist außerdem so schwer löslich, daß

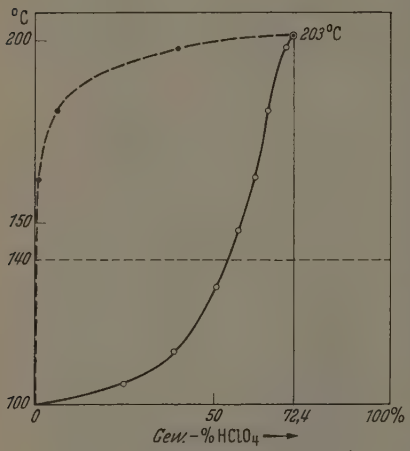


Abb. 7
Siedediagramm des Systems Wasser-Perchlorsäure

seine Fällung auch neben Eisen, Aluminium und Zirkonium (soweit ihre Mengen nicht zu groß sind) quantitativ erfolgt. Carbonate stören und müssen durch vorsichtige Neutralisation gegen Phenolphthalein in der Hitze beseitigt werden, was bestimmt ein Nachteil ist. Die Bestimmung kann jedoch wegen der sonst zu langen Rührzeiten und experimentellen Schwierigkeiten bei der Filtration nur im Mikromaßstab[5] wirklich empfohlen werden. Grundsätzlich stören die Begleitionen bei den meisten gravimetrischen Bestimmungen und sollen daher vorher entfernt werden.

Die sehr einfach scheinenden colorimetrischen Methoden sind nicht weniger störanfällig und man muß neben dem Nachteil optischer Geräte (welche die Genauigkeit auf mindestens 1% vermindern) noch die Abtrennung sämtlicher Störionen meist durch Destillation mit in Kauf nehmen. Doch kann man gerade auf colorimetrischem Wege, besonders aber auch auf fluorescenzcolorimetrischem Wege, wie Willard u. Horton[57] bewiesen, an der Fluorescenzlöschung mit Aluminiummorinat in 50%igem Äthanol bei p_H 4,9 noch sehr kleine Fluormengen bis zu 0,2 μg herab bestimmen. Soweit die colorimetrischen Bestimmungen Ausbleichreaktionen benützen, sind diese mit gewisser Vorsicht zu verwenden, da sie unter Umständen sehr zeitabhängig sind.

Besonders die vielfach angewandten Farblacke des Aluminiums bzw. auch des Zirkoniums mit den verschiedensten Anthrachinonfarbstoffen zeigen bei Zusatz von Fluorionen eine stark zeitabhängige Reaktionsweise, so daß oft Wartezeiten bis zu 18 Std für diese Ausbleichreaktionen vorgeschrieben werden müssen[22,37]. Auch anorganische Farbverbindungen, wie Peroxodisulfatotitansäure[28,29,33,42,43,51,55], werden zur Bestimmung kleinster Fluormengen benützt.

Lediglich im Falle der direkten Farblackbildung (also keiner Ausbleichung) kann dieses Verfahren der colorimetrischen Endbestimmung empfohlen werden. So wird nach der oben geschilderten Destillationsweise (Destillation ohne Destillat![2]) die absorbierte Fluorwasserstoffmenge dadurch bestimmt, daß man mit den noch vorhandenen unverbrauchten Aluminiumionen und dem organischen Triphenylmethanfarbstoff Chromazurol S einen Farblack bildet, der unter den gegebenen Versuchsbedingungen bei 550 nm colorimetrisch rasch erfaßt werden kann[2].

Als dritte am häufigsten gebrauchte Bestimmungsmethode für Fluorionen ist das volumetrische Verfahren zu bezeichnen. Obwohl eine Reihe von Titratoren in der Literatur vorgeschlagen wurden [Eisenchlorid, Aluminiumchlorid, Zirkoniumchlorid, Cer(III)-chlorid[14]], hat sich aus den verschiedensten Gründen die Thoriumnitratlösung doch als beste Maßflüssigkeit erwiesen. Die Titration wird in gepufferter Lösung bei einem p_H-Wert von 3,3 unter Verwendung eines Mischindicators, bestehend aus alizarinsulfonsaurem Natrium und Methylenblau[3], durchgeführt. Die Maßflüssigkeit soll nicht konzentrierter als 0,05 n[46] sein, da

sonst der selbst beim kräftigsten Rühren eingetropfte Thoriumzuschuß von den zu titrierenden Fluorionen nicht so rasch verbraucht werden kann und so durch Bildung des Thoriumalizarinfarblackes ein vorzeitiger Umschlag vorgetäuscht werden kann. Der einmal gebildete Farblack kann nur langsam von den restlichen Fluorionen ausgebleicht werden (Zeitreaktion!). Verdünnte Maßlösungen zeigen diese Eigenschaft nicht mehr und eignen sich daher vorzüglich zur Titration. Bei Einhaltung aller Vorsichtsmaßnahmen gelingt es sogar 0,001 n Maßlösungen zu verwenden. Hierbei stören jedoch schon kleinste Mengen an Phosphationen, wie sie etwa durch das Auswaschen der Gefäße mit phosphathaltigen Waschmitteln adsorbtiv an der Glaswand der Gefäße zurückbleiben.

Nach Rinck stören Phosphationen noch in 10^{-6} m Konzentrationen. Aber auch Kohlensäure darf nicht anwesend sein. Solcherart ist eine Titration von 0,02 n Maßlösung wohl am besten zu empfehlen. Die Reaktionsweise ist eine streng stöchiometrische, was durch eine Kombinationstitration[3], welche man bei ganz verdünnten Maßlösungen anwendet, bewiesen wird. Bei dieser wird der Indicatorfehler durch eine Doppeltitration eliminiert. Der wahre Verbrauch ergibt sich aus der Differenz. Die in der Literatur vielfach vertretene Ansicht der nicht stöchiometrischen Reaktionsweise kann dadurch erklärt werden, daß auch Perchlorate den Umschlagspunkt beeinflussen. Für ganz genaue Bestimmungen wird daher vorgeschlagen, die vorzulegende Natronlauge genau zu dosieren und auch stets nur mit Perchlorsäure (die weit weniger stört als Salzsäure) zu neutralisieren. Auf diese Weise erhält man bei den verschiedenen Titrationen gleiche Verhältnisse und damit vergleichbare Werte. Aus diesem Grund kann auch kein Puffersystem empfohlen werden, ausgenommen das von Kainz[31] aufgezeigte Glycin-Natriumperchlorat-Perchlorsäure-System. Ganz kleine Fluormengen, wie sie z. B. bei Vergiftungen durch organische Fluorpräparate nachzuweisen sind, konnten Dirscherl u. Zacherl[18] nach Aufschluß mit Glycerin und Natriumperoxid in der Wurzschmittbombe und Abdestillieren des Fluorwasserstoffes bei Gegenwart von Schwefelsäure nach Stetter[53] durch jodometrische Messung der durch Fluorid verursachten Schädigung von Phosphatase bestimmen.

Zusammenfassend können somit von den Aufschlußmethoden nur die aggressivsten mit Kalium bzw. Natriumperoxid oder für alle Substanzen, auch gasförmige, der Aufschluß in der Knallgasflamme empfohlen werden. Zur Abtrennung von den störenden Begleitionen wird, soweit dies überhaupt notwendig ist, die Destillation nicht zu umgehen sein. Die Endbestimmung kann für Halbmikromengen am besten maßanalytisch mit 0,02 n Thoriumnitratlösung gegen den neuen Mischindicator und für Mikro- und Submikromengen colorimetrisch durchgeführt werden.

Literatur

[1] Allen, N., u. N. H. Furman: J. Amer. chem. Soc. **54**, 4625 (1932); vgl. diese Z. **96**, 211 (1934). — [2] Ballczo, H., G. Doppler u. A. Lanik: Mikrochim. Acta (Wien) **1957**, 809; vgl. diese Z. **164**, 264 (1958). — [3] Ballczo, H., u. O. Kaufmann: Mikrochem. verein. Mikrochim. Acta **38**, 237 (1951); vgl. diese Z. **136**, 213 (1952). — [4] Ballczo, H., O. Kaufmann u. L. Bittner: Mikrochem. verein. Mikrochim. Acta **39**, 9 (1952); vgl. diese Z. **139**, 456 (1953). — [5] Ballczo, H., u. H. Schiffner: Mikrochim. Acta (Wien) **1956**, 1829; vgl. diese Z. **158**, 292 (1957). — [6] Ballczo, H., u. H. Schiffner: diese Z. **152**, 3 (1956). — [7] Beamish, F. E.: Ind. Engng. Chem. anal. Edit. **5**, 348 (1933); vgl. diese Z. **100**, 430 (1935). — [8] Belcher, R., E. F. Caldas, S. J. Clark u. A. M. G. Macdonald: Mikrochim. Acta (Wien) **1953**, 283, vgl. diese Z. **145**, 362 (1955). — [9] Belcher, R., u. A. M. G. Macdonald: Mikrochim. Acta (Wien) **1956**, 899; vgl. diese Z. **154**, 56 (1957). — [10] Belcher, R., u. A. M. G. Macdonald: Mikrochim. Acta (Wien) **1957**, 510; vgl. diese Z. **160**, 205 (1958). — [11] Belcher, R., u. J. C. Tatlow: Analyst **76**, 593 (1951); vgl. diese Z. **137**, 45 (1952/53). — [12] Benett, C. E., u. E. J. Debbrecht: 131st Meeting, ACS, Miami, Fla., April 1957, Abstracts, S. 24b. — [13] Bockemüller, W.: diese Z. **91**, 81 (1933). — [14] Brunisholz, G., u. J. Michod: Helv. chim. Acta **37**, 598 (1954); vgl. diese Z. **144**, 386 (1955). — [15] Bürger, K.: Z. angew. Chem. **54**, 479 (1941). — [16] Clark, H. S.: Analyt. Chemistry **23**, 659 (1951); vgl. diese Z. **134**, 379 (1951/52). — [17] Dahle, D., u. H. J. Wichmann: J. Assoc. off. agric. Chemists **20**, 297 (1937); vgl. diese Z. **117**, 343 (1939). — [18] Dirscherl, A., u. M. K. Zacherl: Mikrochim. Acta (Wien) **1954**, 340; vgl. diese Z. **145**, 154 (1955). — [19] Eger, C., u. A. Yarden: Analyt. Chemistry **28**, 512 (1956); vgl. diese Z. **154**, 160 (1957). — [20] Ehrenberger, F.: Mikrochim. Acta (Wien) **1959**, 192; vgl. diese Z. **174**, 54 (1960). — [21] Elving, P. J., u. W. B. Ligett: Ind. Engng. Chem., anal. Edit. **14**, 449 (1942). — [22] Elvove, E.: Publ. Health Rep. **48**, 1219 (1933); vgl. Chem. Zbl. **1934**, I, 909. — [23] Erdey, L., L. Mázor u. M. Pápay: Mikrochim. Acta (Wien) **1958**, 482; vgl. diese Z. **168**, 71 (1959). — [24] Fellenberg, Th. v.: Mitt. Gebiete Lebensmittelunters. Hyg. (Bern) **39**, 124 (1948). — [25] Gautier, A., u. P. Clausmann: C. R. Acad. Sci. **162**, 105 (1916). — [26] Geyer, R.: Z. anorg. allg. Chem. **52**, 42 (1943). — [27] Gilbert, M. J., u. J. H. Saylor: Analyt. Chemistry **22**, 196 (1950); vgl. diese Z. **133**, 285 (1951). — [28] Hackl, O.: diese Z. **97**, 254 (1934). — [29] Hill, H. J., u. A. Reynolds: Analyt. Chemistry **22**, 448 (1950); vgl. diese Z. **133**, 290 (1951). — [30] Huckabay, W. B.: Ind. Engng. Chem., anal. Edit. **19**, 154 (1947). — [31] Kainz, G., u. F. Schöller: Mikrochim. Acta (Wien) **1956**, 843; vgl. diese Z. **154**, 159 (1957). — [32] Kimball, R. H., u. L. E. Tufts: Analyt. Chemistry **19**, 150 (1947). — [33] Koritnig, S.: diese Z. **131**, 1 (1950). — [34] Koršun, M. O., u. V. A. Klimova, M. N. Čumačenko: Ž. anal. chim. **10**, 358 (1955); vgl. diese Z. **153**, 42 (1956). — [35] Krause, H.: Chemiker Ztg. **66**, 202 (1942). — [36] Kurtenacker, A.: diese Z. **129**, 410 (1949). — [37] Lamar, W. L., u. Ch. G. Seegmiller: Ind. Engng. Chem., anal. Edit. **13**, 901 (1941). — [38] Ma, T. S.: Microchemic. J. **2**, 91 (1958); vgl. diese Z. **166**, 50 (1959). — [39] Ma, T. S.: Analyt. Chemistry **30**, 1557 (1958); vgl. diese Z. **168**, 434 (1959). — [40] Ma, T. S., u. J. Gwirtsman: Analyt. Chemistry **29**, 140 (1957); vgl. diese Z. **158**, 220 (1957). — [41] Mázor, L.: Mikrochim. Acta (Wien) **1957**, 113; vgl. diese Z. **158**, 440 (1957). — [42] Monnier, D., R. Vaucher u. P. Wenger: Helv. chim. Acta **31**, 929 (1948); vgl. diese Z. **129**, 419 (1949). — [43] Monnier, D., R. Vaucher u. P. Wenger: Helv. chim. Acta **33**, 1 (1950); vgl. diese Z. **133**, 289 (1951). — [44] Parr, S. W.: J. Amer. chem. Soc. **30**, 764 (1908). — [45] Pringsheim, H. H.: Ber. dtsch. chem. Ges. **36**, 4244 (1903). — [46] Rinck, E.: Bull. Soc. chim. France, Mém. (5), **15**, 305 (1948). — [47] Savčenko, A. Y.: Ž. anal. Chim. **10**, 355 (1955); vgl. diese Z. **153**, 43 (1956). — [48] Schöniger, W.: Mikrochim. Acta (Wien) **1955**, 123; vgl. diese Z. **150**,

306 (1956). — [49] SCHÖNIGER, W.: Mikrochim. Acta (Wien) **1956**, 869; vgl. diese Z. **154**, 158 (1957). — [50] SCHÖNIGER, W.: Mikrochim. Acta (Wien) **1959**, 682; vgl. diese Z. **174**, 201 (1960). — [51] SHUMB, W. E.: Analyt. Chemistry **20**, 871 (1948). — [52] SILVEY, G. A., u. G. H. CADY: J. Amer. chem. Soc. **72**, 3624 (1950). — [53] STETTER, H.: Chem. Ber. **81**, 532 (1948); vgl. diese Z. **129**, 419 (1949). — STETTER, H.: Enzymatische Analyse. Verlag Chemie Weinheim/Bergstraße 1951. — [54] VAUGHN, T. H., u. J. A. NIEUWLAND: Ind. Engng. Chem., anal. Edit. **3**, 274 (1931). — [55] WICHMANN, H. J., u. D. DAHLE: J. Assoc. off. agric. Chemists **16**, 612, 619 (1933); vgl. Chem. Zbl. **1934**, I, 2008. — [56] WICKBOLD, R.: Angew. Chem. **64**, 133 (1952); **66**, 173 (1954); vgl. diese Z. **142**, 133 (1954); **145**, 362 (1955). — [57] WILLARD, H. H., u. CH. A. HORTON: Analyt. Chemistry **22**, 1190 (1950); vgl. diese Z. **133**, 287 (1951). — [58] WILLARD, H. H., u. O. B. WINTER: Ind. Engng. Chem., anal. Edit. **5**, 7 (1933); vgl. diese Z. **96**, 213 (1934). — [59] WURZSCHMITT, B.: Mikrochem. verein. Mikrochim. Acta **36/37**, 769 (1951); vgl. diese Z. **134**, 372 (1951/52). — [60] ZIMMERMANN, W.: Mikrochem. verein. Mikrochim. Acta **31**, 15 (1943); **33**, 122 (1946).

Univ.-Dozent Dr. H. BALLCZO, Institut f. anorg. Chemie d. Universität Wien, Wien IX, Währingerstr. 42 (Österreich)

Farbwerke Hoechst AG, vorm. Meister Lucius & Brüning, Frankfurt (Main)-Höchst

Über die Brombestimmung durch Röntgenfluorescenzanalyse

Von

MANFRED HERRMANN

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 18. Oktober 1960)

Die Bestimmung von Chlor und Brom in organischen Substanzen nach den bisher üblichen Methoden bedingt einen Zeitaufwand für eine einzelne Analyse von etwa 6—7 Std; allein für die Chlorierung des Silberbromids werden etwa 2 Std benötigt.

Es wurde nun versucht, eine rationellere Methode der Chlor—Brom-Bestimmung unter Zuhilfenahme eines Röntgenemissionsspektralgerätes aufzufinden. Das zur Verfügung stehende Gerät (Philips Röntgeneinrichtung, Müller Mikro 111 mit Norelco-Goniometer) gestattet eine qualitative und quantitative Bestimmung der Elemente mit den Ordnungszahlen 19—92, wobei Gehalte von $> 0{,}01\%$ sicher erfaßt werden.

Sofern das Röntgengerät mit einer speziellen Vakuumkammer ausgestattet ist, lassen sich auch die Elemente mit niedrigen Ordnungszahlen (ab Natrium bzw. Magnesium) erfassen. Damit kann dann auch das Chlor neben dem Brom in organischen Substanzen auf rein physikalisch-chemischem Wege bestimmt werden.

Die Röntgenemissionsspektralanalyse beruht auf der Tatsache, daß jedes Element bei der Bestrahlung mit polychromatischem Röntgenlicht ausreichender Härte, der sogenannten Primärstrahlung, eine Röntgen-

strahlung charakteristischer Wellenlänge, die Sekundärstrahlung, aussendet. Da die Röntgenstrahlen die Elektronen der inneren Schalen beeinflussen, ist es gleichgültig, in welchem physikalischen oder chemischen Zustand sich die zu analysierende Probe befindet; man kann also sowohl feste als auch flüssige Substanzen einsetzen.

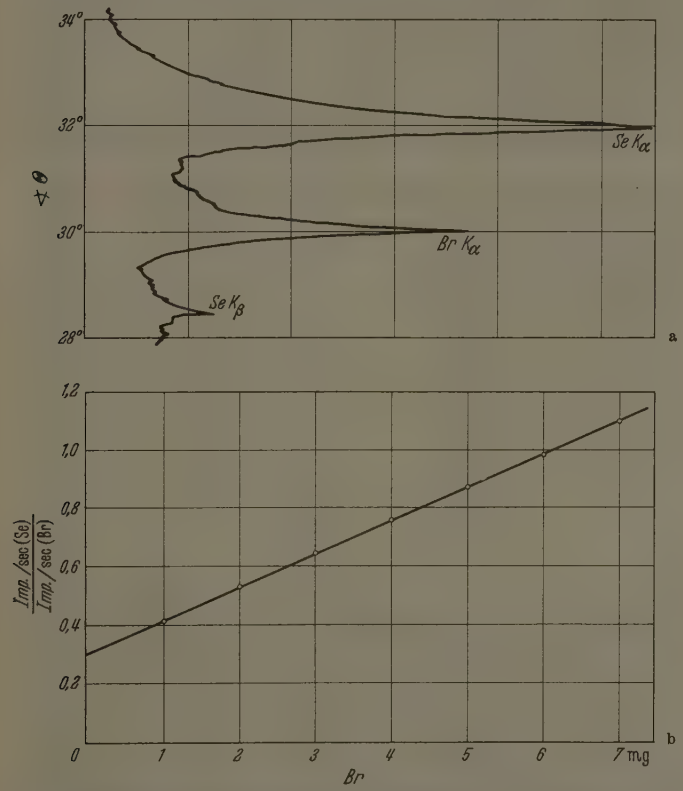


Abb. 1. a Röntgenogramm einer Br-Se-Lösung; b Eichkurve für die Br-Bestimmung. (W-Röhre: 30 kV; 10 Milliamp.)

Der große Vorteil der Röntgenmethode liegt in der Zeitersparnis. Bei Serienanalysen ist es möglich, eine Brombestimmung in 10—15 min quantitativ durchzuführen.

Zur Auswertung der Meßergebnisse kann man grundsätzlich zwei verschiedene Methoden anwenden. Ein Verfahren beruht auf der Zählung der einzelnen Röntgenquanten, die vom Brom ausgestrahlt werden. Aus

einer Eichkurve, auf der die Impulse/sec gegen die Konzentration des Broms aufgetragen sind, läßt sich der Gehalt an Brom ermitteln.

Der Nachteil dieses Verfahrens liegt darin, daß bei der Impulszählung auch die Impulse des Untergrundes mit erfaßt werden und daher von der Gesamtimpulszahl subtrahiert werden müssen. Die Impulsfrequenz des Untergrundes schwankt etwas, insbesondere über lange Zeiträume hinweg, so daß die Werte für die Meßwertimpulse mit den Fehlern dieser Schwankungen behaftet sind.

Mit Hilfe eines anderen Verfahrens, das als „Methode des inneren Standards" bezeichnet wird, erreicht man eine größere Analysengenauigkeit. Dieses Prinzip wird bei der vorliegenden Bestimmungsmethode

Tabelle 1. *Testversuche mit KBr-Lösungen zur röntgenographischen Br-Bestimmung*

Nr.	theoretischer Bromgehalt (mg)	röntgenograph. ermittelter Bromgehalt (mg)
1	2,00	2,06
2	2,00	1,95
3	3,00	3,00
4	3,00	3,06
5	4,00	4,04
6	5,00	5,07
7	6,00	6,03
8	6,00	5,98
9	7,00	6,92
10	8,00	7,93

Tabelle 2. *Röntgenographische Doppelbestimmung von Brom in organischen Substanzen*

Nr.	% Brom	
	1. Bestimmung	2. Bestimmung
1	20,8	20,7
2	12,5	12,5
3	25,6	25,8
4	29,6	29,4
5	25,6	25,8
6	28,9	29,0
7	18,6	18,7
8	25,9	25,9
9	25,6	25,8
10	26,9	26,7

angewendet. Man setzt der zu untersuchenden Probelösung mit unbekanntem Bromgehalt eine *bekannte* Menge eines anderen Elementes zu, hier wird Selen als innerer Standard verwendet. Man vergleicht nun die Intensität der Bromlinie mit der Intensität der Standardvergleichslinie. Nunmehr braucht man nur noch die Anregungsstrahlung über den Zeitraum konstant zu halten, der zum Auszählen der Impulse beider Linien notwendig ist. Andere Fehler wirken sich während der Messung sowohl auf die Analysen- als auch auf die Vergleichslinie in der gleichen Weise aus, so daß das Verhältnis von Impulszahl des Standards zur Impulszahl des Broms nicht geändert wird. Aus einer analog aufgestellten Eichkurve wird dann der Bromgehalt ermittelt. (Siehe Abb. 1a und b.)

Die Vorbereitung der Proben für die Röntgenanalyse geschieht in folgender Weise:

150—200 mg der Substanz werden unter Zusatz von einigen Tropfen Äthylenglykol, etwas Kaliumnitrat und einer ausreichenden Menge Natriumperoxyd in einer Bombe nach der Methode WURZSCHMITT aufgeschlossen. Der Bombeninhalt wird mit dest. Wasser herausgelöst, wobei etwas Natriumhydrogensulfit zugesetzt wird,

damit das gesamte Brom als Bromid vorliegt. Die Lösung wird nach dem Ansäuern mit Schwefelsäure (1:1) in einen 100 ml-Kolben filtriert und mit Wasser aufgefüllt. Durch potentiometrische Titration mit 0,1 n $AgNO_3$-Lösung wird in aliquoten Teilen der Gesamthalogengehalt bzw. röntgenspektralanalytisch der Bromgehalt bestimmt. Zur Brombestimmung werden 10,0 ml der Aufschlußlösung mit 5,0 ml einer Selenitlösung versetzt, die genau 1,0 mg Se/ml enthält. Die Mischung wird in den Probenhalter gefüllt. Man zählt die Röntgenimpulse für die Br-Kα-Linie bei $\sphericalangle$ $2\,\Theta = 29{,}96°$ und für die Se-Kα-Linie bei 31,88°. Die Anregung wird mit einer Wolframröhre mit 30 KV; 10 mAmp. durchgeführt, wobei jeweils 25600 Impulse ausgezählt werden, als Analysatorkristall wird Lithiumfluorid verwendet. Aus dem Verhältnis der Zählzeiten wird der Bromgehalt aus der Eichkurve ermittelt.

Die Röntgenbestimmung dauert etwa 10—15 min, die gesamte Chlor-Brom-Bestimmung erfordert etwa $^1/_6$ der früher benötigten Zeit.

Tab. 1 gibt ein Bild über die Genauigkeit der Röntgenmethode, als Prüfsubstanz wurde eine Bromidlösung verwendet, die aus analysenreinem Kaliumbromid hergestellt wurde.

Tab. 2 gibt einen Überblick über die Reproduzierbarkeit der Methode. Die Analysenproben mit verschiedenen Bromgehalten wurden entsprechend der Vorschrift aufgeschlossen. Es wurde jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Tab. 3 stellt die Ergebnisse der Brombestimmung nach der klassischen und nach der röntgenographischen Methode gegenüber.

Tabelle 3. *Bestimmung von Brom in organischen Substanzen*

Nr.	% Br gefunden durch Chlorierung	% Br gefunden röntgenographisch
1	21,4/21,5	21,5
2	21,2/21,6	21,6
3	28,4/28,5	28,5
4	26,1/26,1	25,6
5	20,5/20,6	20,4/20,4
6	23,8/23,5	24,0
7	28,7/28,7	28,7
8	25,3	25,1
9	28,7	28,4
10	29,5	29,0
11	27,5	27,1
12	36,0	36,3

Wie Tab. 3 zeigt, stehen die Ergebnisse in guter Übereinstimmung mit den chemisch ermittelten Werten.

Zusammenfassung

Durch Anwendung der Röntgenfluorescenzanalyse an Stelle der bisher üblichen Methoden bei der quantitativen Bestimmung von Brom in organischen Substanzen läßt sich eine beträchtliche Zeitersparnis erzielen. Dies gilt besonders bei Anwesenheit anderer Halogenide wie Chlor oder Jod. Die Bestimmung wird unter Zugabe von Selen nach der „Methode des inneren Standards" durchgeführt, die Analysengenauigkeit deckt sich mit den Ergebnissen der bisher naßchemisch durchgeführten Bestimmungen.

Herrn Dr. F. Ehrenberger und Dr. S. Gorbach danke ich für Anregungen und für ihre wertvolle Mitarbeit.

Dr. M. Herrmann, Farbwerke Hoechst AG., Frankfurt (Main)-Höchst

II. Bestimmung funktioneller Gruppen organischer Verbindungen

Badische Anilin- u. Soda-Fabrik AG, Ludwigshafen am Rhein,
Untersuchungslaboratorium

Die Bestimmung der Kohlenstoff-Mehrfachbindung

Von
K. Müller

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 10. November 1960)

Mit der steigenden Bedeutung der Acetylen- und Kunststoffchemie hat sich die Analyse von Verbindungen, welche Kohlenstoffmehrfachbindungen, d. h. Doppel- und Dreifachbindungen enthalten, zu einem wichtigen Gebiet der organischen Analyse entwickelt, insbesondere in Laboratorien der chemischen Großindustrie, welche die monomeren Ausgangsprodukte für Kunststoffe und die polymeren Kunststoffe selbst herstellt. Durch die „Reppe-Chemie" sind viele ungesättigte Verbindungen, die früher höchstens wissenschaftliches Interesse hatten bzw. überhaupt nicht bekannt waren, technische Produkte geworden, für die Analysenmethoden ausgearbeitet werden mußten. Ein Teil dieser Analysenmethoden wurde aus der Fett- und Kohlenwasserstoffchemie übernommen, nachdem sie auf ihre Anwendbarkeit auf das Gebiet der polymerisierbaren Monomeren überprüft worden waren; andere Analysenmethoden sind neu oder notwendig gewordene Modifikationen der früheren Methoden. Die für technische Zwecke in Frage kommenden Analysenmethoden müssen gewisse Forderungen erfüllen:

1. sie müssen geeignet sein zur *Gehaltsbestimmung der reinen Verbindungen und der Rohprodukte*, wobei im letzten Fall öfters mehrere ungesättigte Verbindungen nebeneinander und neben sonstigen Verbindungen oder in Lösungsmitteln zu bestimmen sind; die *Spezifität* der Methoden muß deshalb bekannt sein;

2. die Methoden müssen zur *Bestimmung kleiner Mengen* geeignet sein, besonders wenn sie zur Bestimmung des sogenannten Monomerenanteils in Polymeren herangezogen werden sollen.

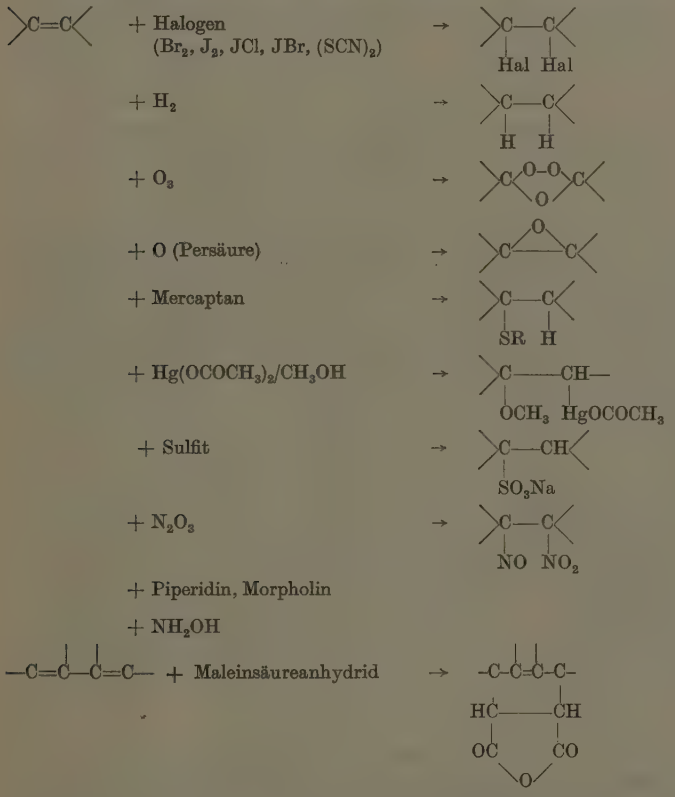
Viele der neuerdings auftretenden Probleme können mit *einer* Methode oder mit chemischen Methoden allein oft nicht gelöst werden. Die Lösung gewisser Aufgaben ist nur möglich unter Heranziehung physikalischer Methoden, insbesondere der analytischen und präparativen

Gaschromatographie für Trennprobleme, der IR- und Raman-Spektroskopie und der Kernresonanz für Konstitutionsermittlungen und der UV-Spektroskopie für Spurenbestimmungen.

Der vorliegende Bericht soll jedoch nicht diese physikalischen Methoden behandeln, sondern einen Überblick über die chemischen Methoden geben.

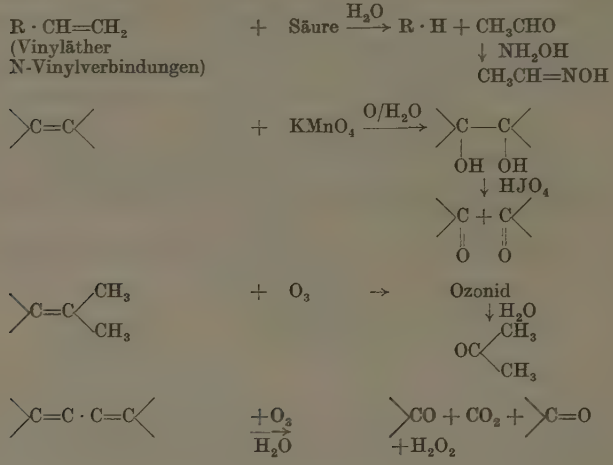
Die wichtigsten *chemischen* Methoden zur *Bestimmung der Doppelbindung* beruhen auf *Additionsreaktionen*; in speziellen Fällen verwendet man *Spaltungsreaktionen*.

Tabelle 1. *Bestimmung von Doppelbindungen durch Additionsreaktionen*



Die Tab. 1 und 2 geben eine Übersicht über bisher zur Bestimmung von Doppelbindungen vorgeschlagene Additions- bzw. Spaltungsreaktionen.

Tabelle 2. *Bestimmung von Doppelbindungen durch Spaltungsreaktionen*



Die wichtigsten chemischen Methoden zur Bestimmung des *Acetylens und seiner monosubstituierten Derivate* beruhen nicht auf Additionsreaktionen, sondern auf der sauren Natur von mindestens einem H-Atom, das mit Schwermetallsalzen unter Acetylidbildung reagiert. *Acetylenderivate mit nicht endständiger Dreifachbindung* sind zur Acetylidbildung nicht befähigt; sie müssen deshalb nach einem anderen Prinzip bestimmt werden. In Tab. 3 sind Methoden zur Bestimmung von Dreifachbindungen zusammengefaßt:

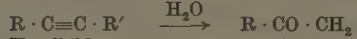
Tabelle 3. *Bestimmung von Acetylenderivaten*

I. Acetylen und monosubstituierte Derivate $R \cdot C \equiv CH$

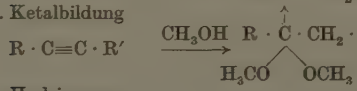
1. Acetylidbildung mit:
   - Ag-Salzen : Nitrat, Acetat, Benzoat
   - Cu(I)-Salzen : Ilosvay-Reagens
   - Hg(II)-Salzen : K_2HgJ_4
2. Jodsubstitution
3. Hydrierung
4. Grignard-Reaktion

II. Mono- und disubstituierte Derivate $R \cdot C \equiv C \cdot R'$

1. Hydratisierung



2. Ketalbildung



3. Hydrierung

Die Tab. 1—3 lassen erkennen, daß eine Anzahl von Methoden zur Bestimmung von Doppel- und Dreifachbindungen möglich sind, die nun auf verschiedene Verbindungstypen angewendet werden sollen. Im Rahmen dieses Berichtes ist es natürlich nicht möglich, alle diese Methoden und ihre Anwendungen zu berücksichtigen.

I. Bestimmung der Kohlenstoff-Doppelbindung

Von der Anzahl grundsätzlich möglicher Methoden zur Bestimmung der Doppelbindung seien nur Additionsreaktionen ausgewählt und diejenigen genauer besprochen, deren Anwendungsbereich von uns untersucht worden ist; dies sind:

einige Halogenadditionsreaktionen, die Addition von Hg-Acetat, die Addition von Mercaptan, die Addition von Sulfit, die katalytische Hydrierung.

In der Fettchemie dienen Doppelbindungsbestimmungsmethoden zur Charakterisierung von Fetten und höheren Fettsäuren, auf dem Erdölgebiet zur Bestimmung des Ungesättigtheitsgrades von KW-Stoffen und KW-Stoffgemischen. Auf dem Kunststoffgebiet beruhen Methoden zur Bestimmung des Reinheitsgrades polymerisierbarer Monomerer und des Monomerenanteils von Polymeren auf der Bestimmung der Doppelbindung. In vielen Fällen ist es möglich, gewisse Doppelbindungsbestimmungsmethoden zur Bestimmung der *Lage* der Doppelbindung (z. B. der endständigen Doppelbindung, der zur Carboxylgruppe benachbarten Doppelbindung, der konjugierten Doppelbindung) heranzuziehen oder eine bestimmte ungesättigte Verbindung in einem Gemisch zu bestimmen. In solchen Fällen ist die Verwendung selektiver Methoden wichtig.

Während es sich in der Fett- und Kohlenwasserstoffchemie im wesentlichen um die Bestimmung von durch Substituenten nicht oder wenig beeinflußten Doppelbindungen handelt, sind auf dem Gebiete der polymerisierbaren Monomeren meist solche Doppelbindungen zu bestimmen, die durch unmittelbar benachbarte Substituenten, wie Äther-O, CO- und OH-Gruppen, Carboxyl- und Estergruppen, Nitril- und Säureamidgruppen sowie heterocyclische Ringe, beeinflußt werden können. Hierher gehörende Verbindungen sind z. B.: Vinyläther, Acryl-, Methacryl- und Maleinsäure und deren Ester, Nitrile und Amide der Acryl- und Methacrylsäure, N-Vinylpyrrolidon, N-Vinylcarbazol.

1. Halogenadditionsmethoden

Im Prinzip beruhen die Halogenadditionsreaktionen auf der Einwirkung einer überschüssigen Halogenlösung bekannten Gehaltes auf die zu bestimmende, in einem indifferenten Lösungsmittel gelöste Substanz und Rücktitration des Halogenüberschusses. Die grundsätzlichen *Schwierigkeiten* sind:

Hinderung der Halogenaddition durch Substituenteneinfluß (sterische Hinderung, Hinderung durch der Doppelbindung benachbarte negative Gruppen) und *Substitution.*

Die Hinderung durch Substituenteneinfluß spielt eine Rolle bei der Bestimmung der Monomeren, deren Doppelbindung durch die vorhin erwähnten Substituenten beeinflußt wird. Die Vermeidung der Substitution, die zu hohe Werte vortäuscht, ist das Hauptziel der zur Bestimmung olefinischer KW-Stoffe ausgearbeiteten Methoden.

Die Halogenadditionsmethoden und deren Ausführungsformen unterscheiden sich hinsichtlich der Art des Halogens und des Reaktionsmediums, der Konzentration bzw. des Reagensüberschusses, der Reaktionszeit und Temperatur, der Gegenwart oder Abwesenheit eines Katalysators und der Titrationsart bzw. der Endpunktsbestimmung.

Die folgenden Tab. 4 und 5 geben eine Auswahl von Halogenierungsmethoden zur Bestimmung der Doppelbindung. *Chlor* als Halogenierungsmittel fehlt; es hat sich kaum eingeführt, da Chlorlösungen nicht titerbeständig sind und die Gefahr von Substitutionsreaktionen besonders groß ist.

Tabelle 4. *Bestimmung der Doppelbindung durch Bromaddition*

Methode von	Halogen	Reagens	Lösungsmittel (Katalysator)
McIlhiney[22] (1894)	Brom	Br_2 in CCl_4	CCl_4
Braae[4] (1949)	Brom	Br_2 in CCl_4	$CH_3OH/HCl/HBr$; $HgCl_2$
Winkler[38] (1909/14)	nasc. Brom	$KBrO_3$ + 5KBr/ HCl	CCl_4; W.
Lucas u. Pressman[21] (1938)	nasc. Brom	$KBrO_3$ + 5KBr/H_2SO_4	W. oder CCl_4; $HgSO_4$
Dubois u. Skoog[9] (1948)	nasc. Brom	$KBrO_3$ + 5KBr/H_2SO_4	Eg. + CH_3OH + CCl_4; $HgCl_2$
Albertson u. McGregor[1] (1950)	nasc. Brom	$KBrO_3$ +5KBr/ Säure	Pyridin (für Polymere)
Rosenmund u. Kuhnhenn[29] (1923)	Brom	Pyridinsulfatdibromid in Eg.	CCl_4
Kaufmann[16] (1926)	Brom	Br_2 in mit NaBr gesätt. CH_3OH	Chlf; CH_3OH; Chlf.—CH_3OH
Byrne u. Johnson[6] (1956)	Brom	Br_2 in mit NaBr gesätt. CH_3OH + NaBr	CH_3OH, A., Eg., W.; HCl
Critchfield[7] (1959)	Brom	Br_2 in mit NaBr gesätt. CH_3OH + NaBr	W.

Bei dieser ersten Gruppe von Halogenierungsmethoden wird *Brom* als Halogenierungsmittel (Tab. 4) verwendet, und zwar Brom in verschiedenen Formen:

in einem indifferenten Lösungsmittel gelöst,
im status nascendi aus Bromid-Bromat + Säure,
in Form von Pyridinsulfat-Dibromid und
in Form der Anlagerungsverbindung $NaBr \cdot Br_2$.

Tab. 5 zeigt Methoden mit den Halogenierungsmitteln: Jod, Chlorjod, Bromjod, Rhodan und Jodrhodan.

Tabelle 5. *Bestimmung der Doppelbindung durch Halogenaddition*

Methode von	Halogen	Reagens	Lösungsmittel
Margosches[24] (1924)	Jod	Jod in A.	Alkohol
Siggia u. Edsberg[33] (1948)	Jod	J/KJ in W.	Methanol
Hübl[13] (1884)	ClJ	J in A. + $HgCl_2$	Chlf. oder CCl_4
Wijs[36] (1898)	ClJ	JCl_3 + J in Eg.	Chlf. oder CCl_4
Hanuš[11] (1901)	BrJ	BrJ in Eg.	Chlf.
Kaufmann[17] (1926)	Rhodan	$(SCN)_2$ aus $Pb(SCN)_2$ + Br_2 in Eg. + Acetanhydrid + CCl_4	
Kaufmann u. Grosse-Oetringhaus[19] (1937)	JSCN	JSCN aus $Pb(SCN)_2$ + Br_2 + J_2 in CCl_4 oder Bzl. + Eg. + Acetanhydrid	

Von den in Tab. 4 und 5 angeführten Methoden seien nur die Bromierungsmethoden von Kaufmann[16] und von Winkler[38] und die Jodadditionsmethode von Siggia u. Edsberg[33] genauer besprochen.

a) Bromierungsmethoden. Kaufmann verwendet als Bromierungsmittel eine überschüssige, mit NaBr gesättigte methanolische Bromlösung, die besonders titerbeständig ist. Der Bromüberschuß wird arsenometrisch oder jodometrisch zurücktitriert. Die Methode ist zur Bestimmung von *Olefinen* im allgemeinen gut geeignet. Geradkettige Olefine reagieren quantitativ. Bei verzweigten Olefinen ist allerdings mit Substitution zu rechnen, die man durch Verkürzung der Reaktionszeit und Herabsetzung der Temperatur auf 0° C weitgehend vermeiden kann.

Nach Winkler läßt man auf die in Wasser oder CCl_4 gelöste Substanz Brom aus Bromid/Bromat + Säure einwirken.

In Tab. 6 sind Ergebnisse, die an verschiedenartigen ungesättigten Verbindungen nach den Methoden von Kaufmann und von Winkler erhalten wurden, gegenübergestellt.

Allylalkohol und *Butendiol*, d. h. ungesättigte Alkohole lassen sich gut durch nascierende Bromierung bestimmen. Die Originalmethode von Kaufmann erscheint nicht ganz zuverlässig; in der Modifikation von Byrne u. Johnson[6], deren Reaktionslösung zusätzlich katalytisch wirkende HCl, Wasser und NaBr als Bodenkörper enthält, wird die genaue JZ für Allylalkohol gefunden.

Crotonaldehyd und *Acrolein*, d. h. α,β- ungesättigteAldehyde, sind durch nascierende Bromierung gut bestimmbar, ebenso durch die modifizierte Kaufmann-Methode nach BYRNE u. JOHNSON.

Tabelle 6. *Bestimmung der Doppelbindung durch Bromierung*

	JZ theoretisch	JZ gefunden				
		nasc. Brom	nach KAUFMANN		nach BYRNES u. JOHNSON (HCl-Katalyse)	nach CRITCHFIELD (Na-Salz)
			10 min	120 min		
Vinylchlorid	407	445	1,6	1,6	—	—
Allylalkohol	438	442	427	432	438	—
Butendiol	289	289	282		—	—
Acrolein	454	451	396	411	454	—
Crotonaldehyd	363	363	344		363	—
Vinylmethylketon	363	335	312	327	—	—
Acrylsäure	353	353	8,4	40,6	—	353
Acrylsäurebutylester	198,5	203	12	45	—	198
Crotonsäure	296	296	38	82	—	296
Undecylensäure	136	148	137		—	—
Zimtsäure	171,5	180	12	142	—	—
Maleinsäure	219	22	1	3	—	218
Fumarsäure	219	29	7	30	—	218
Acrylnitril	479,5	152	14	16	—	—
Dihydromuconsäuredinitril	239	238	—		—	—
Vinylacetat	296	257/86	298/307	317	296	—
2-Äthoxy-4-methyl-2,3-dihydropyran	178	—	178	181	—	—
Vinylpyrrolidon	229	140/200	216	231	—	—
Vinylcarbazol	131,5	68	328	388	—	—

Acrylsäure, *Crotonsäure*, ebenso *Polyacrylsäure* addieren quantitativ nascierendes Brom an ihrer Doppelbindung; die Jodzahlen für die Ester liegen etwas zu hoch. Die Methode von KAUFMANN versagt hier. Die Na- und K-*Salze* dieser α,β-ungesättigten Säuren addieren jedoch, wie wir vor etwa 10 Jahren fanden und wie CRITCHFIELD[7] 1959 veröffentlicht hat, quantitativ Brom bei Verwendung einer (modifizierten) Kaufmannschen Bromlösung. Durch die Methode von CRITCHFIELD werden auch die sehr schwer bromierbare Malein- und Fumarsäure in Form ihres Salzes durch Bromierung bestimmbar, ebenso ihre Ester nach vorheriger milder Verseifung.

Acrylnitril addiert nach KAUFMANN nur Bruchteile der theoretischen Brommenge. Nascierendes Brom gibt sehr schwankende, wesentlich zu niedrige Jodzahlen; in Gegenwart von Hg-Sulfat wird jedoch nascierendes Brom quantitativ an Acrylnitril addiert. Überraschend fanden wir allerdings, daß die Methode der Hg-katalytischen Bromaddition bei

Gemischen aus Acrylnitril + Acrylsäure wesentlich zu hohe Werte gibt, obwohl sie bei den einzelnen *reinen* Komponenten genaue Werte liefert.

Vinylacetat läßt sich durch nascierende Bromierung oder nach KAUFMANN nicht zuverlässig bestimmen, ebenso *Vinyläther*; der cyclische Äther 2-Äthoxy-4-methyl-2,3-dihydropyran ist nach KAUFMANN gut bestimmbar.

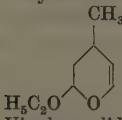
Vinylcarbazol ergibt nach der Kaufmannschen Methode infolge Substitution genau das 3fache der berechneten JZ.

b) Jodadditionsmethode. Die Jodadditionsmethode von SIGGIA u. EDSBERG[33] (Einwirkung einer wäßrigen Jodlösung auf die in Methanol gelöste Substanz) wurde ursprünglich als Bestimmungsmethode für *Vinyläther*, die sich nicht besonders gut durch Bromierung bestimmen lassen, veröffentlicht. Die Jodaddition verläuft bei Vinyläthern nach der in Tab. 7 angeführten Gleichung. Das überschüssige Jod wird mit Thiosulfat (ohne Stärke) zurücktitriert.

Tabelle 7. *Bestimmung von Doppelbindungen*

Jodaddition an Vinyläther

$$ROCH = CH_2 + CH_3OH + J_2 \rightarrow RO \cdot CH(OCH_3) - CH_2J + HJ$$

$RO \cdot CH = CH_2$; R = CH_3-, C_2H_5-, C_4H_9-	+
$C_{11}H_{23}OCH = CH_2$	(−) +
$C_{18}H_{37}OCH = CH_2$	(−) +
$CH_3OCH_2CH_2O \cdot CH = CH_2$	+
$HOCH_2CH_2OCH_2CH_2O \cdot CH = CH_2$	+
$H_2C = CH \cdot CH_2 \cdot O \cdot CH = CH_2$	+ (1/—)
Dihydroabietinolvinyläther	+
	+
Vinylpyrrolidon	+
Vinylcaprolactam	+
Vinylcarbazol	+
Styrol	—
Vinylacetat	—
ungesätt. Säuren, deren Ester, Amide, Nitrile	—
ungesätt. Alkohole, Aldehyde, Ketone	—

Tab. 7 zeigt den Anwendungsbereich der Methode. Hierzu ist zu bemerken, daß sich *höhere* Vinyläther nach den Angaben von SIGGIA wegen ungenügender Löslichkeit nicht quantitativ bestimmen lassen. Durch Erhöhung des Anteils an organischem Lösungsmittel (Äthanol + Methanol: $H_2O \sim 5:1$) und in Gegenwart von Na-Acetatpuffer lassen sich auch höhere Vinyläther ohne weiteres bestimmen. Überhaupt ist es von Vorteil, eine Puffersubstanz, wie Natriumacetat oder Kaliumhydrogen-

phthalat, zur Reaktionslösung hinzuzusetzen. Ebenso konnten cyclische Äther, wie 4-Methyl-2-äthoxy-2,3-dihydropyran, durch die Jodmethode bestimmt werden. Wichtig erwies sich diese Methode insbesondere zur Bestimmung von Vinylpyrrolidon und Vinylcarbazol. *Vinylpyrrolidon* läßt sich auch durch die Methode von Kaufmann bei verlängerter Reaktionszeit (und durch Hydrierung) bestimmen. Am einfachsten ist jedoch die Jodadditionsmethode unter Verwendung von Natriumacetat oder Kaliumhydrogenphthalat (bei p_H 4) als Puffersubstanz, wenn bei einer Reaktionszeit von 30 min ein größerer Jodüberschuß angewandt wird. Die Jodadditionsmethode ließ sich auch zu einer Mikromethode zur Bestimmung des Vinylpyrrolidons bei Einwaagen von 0,4—0,8 mg und zu einer Bestimmung des sogenannten Monomerenanteils in Polyvinylpyrrolidon umgestalten. *Vinylcarbazol*, das bei der Kaufmann-Methode infolge Kernsubstitution 3 Doppelbindungen vortäuscht, läßt sich durch die Jodmethode in Gegenwart von Phthalatpuffer bestimmen, auch im Mikromaßstab bis herab zu Mengen von 0,1 mg/10 ml Lösung. Auch der sogenannte Monomerenanteil des Polyvinylcarbazols läßt sich durch die Jodmethode bestimmen, wenn die Lösung des Polyvinylcarbazols in Methylenchlorid nach Methanolzusatz mit der wäßrigen Jodlösung 30 min geschüttelt wird.

Wie Tab. 7 weiter zeigt, lagern eine Anzahl ungesättigter Verbindungen überhaupt kein Jod an. Die Jodmethode erscheint deshalb wegen ihrer Spezifität wertvoll.

2. Quecksilber(II)-acetat-methode

Eine weitere Methode zur Bestimmung von ungesättigten Verbindungen beruht auf der Anwendung von *Quecksilber(II)-acetat*, die auf Tausz[34] zurückgeht. Etwa gleichzeitig schlugen Marquardt u. Luce[25] und Martin[27] die Verwendung von Quecksilber(II)-acetat zur Bestimmung des Styrolgehaltes in Äthylbenzol und Dichloräthylbenzol bzw. zur Bestimmung von Styrol und substituierten Styrolen vor. Die Reaktion beruht auf der Gleichung in Tab. 8. Bestimmt wird entweder das überschüssig angewandte Hg^{2+}, z.B. komplexometrisch nach Buděšínský[5], der die Reaktion in Methanol noch in Gegenwart von BF_3-Ätherat vor sich gehen läßt, oder die freigewordene Essigsäure, die der angelagerten Quecksilberacetatmenge äquivalent ist. Letzteres ist die Arbeitsweise von Martin, der als Lösungsmittel $CCl_4 + CH_3OH$ verwendet und bei kleiner Reaktionsgeschwindigkeit $NaNO_3$ hinzusetzt, und von Johnson u. Fletcher[14]. Johnson u. Fletcher modifizierten die Methode insbesondere zu einer Methode zur Bestimmung von Vinyläthern, indem sie hier bei —10 bis —15° C arbeiten, einer Temperatur, bei der die entstandene Quecksilberverbindung mit Sicherheit stabil ist.

Tab. 8 zeigt eine Auswahl von Verbindungen, welche durch die Quecksilber(II)-acetatmethode bestimmbar sind. Vinylacetat wird

übrigens unter den Versuchsbedingungen verseift, so daß 2 Mol Essigsäure titriert werden. In Gegenwart katalytisch wirkender Mengen starker Säuren ($HClO_4$) ist die Mercuriacetataddition nach MALLIK u. DAS[23] auch zur Bestimmung von Acryl- und Methacrylsäure geeignet.

Tabelle 8. *Bestimmung von Doppelbindungen durch Addition von Mercuriacetat*

$$R \cdot CH = CH_2 + Hg(OCOCH_3)_2 + H_2O(CH_3OH)$$
$$\rightarrow R \cdot \underset{\displaystyle OH(CH_3)}{CH}\!\!-\!\!\underset{\displaystyle HgOCOCH_3}{CH_2} + CH_3COOH$$

Die Methode eignet sich zur Bestimmung von:
Styrol, Vinyltoluol, Vinylxylol
Monochlorstyrol, Dichlorstyrol
Vinyläthern, Diallyläther
Allylalkohol
Allylacetat, Diallylphthalat
Vinylacetat, Vinylbenzoat
Allylaceton
Vinylcarbazol u. a.

Voraussetzung für die Anwendbarkeit der Methode scheinen endständige Doppelbindungen zu sein. Wichtig ist auch die Qualität des Quecksilberacetats, das wasserfrei sein muß und möglichst wenig freie Essigsäure enthalten soll. Eine interessante Anwendung der Anlagerung von Quecksilberacetat an Doppelbindungen besteht nach HUBER[12] darin, daß es dadurch gelingt, Olefine in nicht flüchtige, zur Papierchromatographie geeignete Verbindungen überzuführen. Zur Sichtbarmachung der Flecken wird die Hg-Verbindung mit gasförmigem HCl gespalten und mit Ammoniumsulfid besprüht, wodurch schwarzes HgS entsteht.

3. Mercaptanmethode

Eine Bereicherung der Methoden zur spezifischen Bestimmung gewisser Doppelbindungen ist die *Mercaptan*methode von BEESING u. Mitarb.[3]. Das Prinzip der Methode beruht auf der sich in kurzer Zeit vollziehenden Addition von Mercaptan in alkoholischer Lösung an die Doppelbindung α,β-ungesättigter Carbonylverbindungen und Nitrile in Gegenwart eines basischen Katalysators:

$$R \cdot CH{=}CH \cdot \underset{\displaystyle O}{\overset{\displaystyle \|}{C}}\, x + R'SH \rightleftarrows R \cdot \underset{\displaystyle SR'}{CH} \cdot CH_2\, CO\, x \quad (x = H, R_1, OR_2)$$

$$CH_2{=}CH \cdot CN + R'SH \rightleftarrows \underset{\displaystyle SR'}{CH_2} \cdot CH_2\, CN.$$

Das überschüssige Mercaptan wird mit Jodlösung zurücktitriert. Verwendet wird das leicht darstellbare, fast geruchlose Dodecylmercaptan.

Tab. 9 zeigt die Verbindungen, auf welche die Methode anspricht und welche nicht quantitativ oder überhaupt nicht mit Mercaptan reagieren. Ungesättigte KW-Stoffe, Alkohole, Äther, ungesättigte Säuren und Aldehyde, die keine α,β-ständige Doppelbindungen besitzen, lagern kein Mercaptan an. α,β-ungesättigte Säuren reagieren im Gegensatz zu ihren

Tabelle 9. *Bestimmung von Doppelbindungen Mercaptanaddition*

$$—CH=CH— + RSH \rightarrow —\underset{\underset{SR}{|}}{CH}—CH_2—$$

Octadecylen, Myrcen, Butadien, Styrol	—
Acetylen, Monovinylacetylen	—
Vinylchlorid	—
Allylalkohol, Butendiol	—
Vinylacetat, -propionat	— (~ 50%)
Vinyläther	—
Oleylaldehyd	—
Crotonaldehyd, Zimtaldehyd	+
Mesityloxyd	+
Acrylsäure, Crotonsäure	—
Acrylsäure*ester*, Crotonsäure*ester*	+
Methacrylsäureester	+
Malein-, Fumarsäure	—
Malein-, Fumarsäure*ester*	+
Acrylnitril	+
Dihydromuconsäurenitril	+
Acrylamid	+
N-Vinylpyrrolidon, -carbazol	—
Vinylsulfosäure*ester*	+

Estern nicht; die Ester, z. B. Acrylester und Vinylsulfonsäureester, sind deshalb in Gegenwart der freien Säuren bestimmbar. Auch Diacrylsäure $CH_2 = CH \cdot COO\,CH_2\,CH_2 \cdot COOH$ läßt sich durch Mercaptanaddition bestimmen. Die Methode eignet sich besonders gut zur Bestimmung von Acrylnitril, Acrylamid, Malein- und Fumarsäureestern. Methacrylnitril erfordert eine längere Reaktionszeit. N-substituierte Acrylamide, wie N-Dibutylacrylamid lagern nur teilweise bzw. langsam Mercaptan an und sind deshalb besser durch Hydrierung (siehe unten) zu bestimmen. In Lösungen, die *Acrylnitril* und Styrol enthalten, ist Acrylnitril einfach durch Mercaptanaddition zu bestimmen, da Styrol mit Mercaptan nicht reagiert.

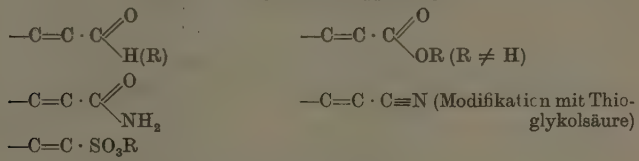
Acrylnitril läßt sich auch statt durch Addition von Dodecylmercaptan durch *Addition von Thioglykolsäure* $HS \cdot CH_2\,COOH$, die auch ein Mercaptan darstellt, bestimmen; innerhalb von 60 min lagert Acrylnitril in neutralem wäßrigem Medium bei Raumtemperatur quantitativ Thioglykolsäure an. Der Vorteil dieser Bestimmungsart liegt darin, daß in wäßrigem Medium gearbeitet wird, so daß die Indikation bei der Rücktitration mit Jodlösung durch Stärke erfolgen kann.

Tab. 10 zeigt nochmals zusammengefaßt die Gruppen, welche Mercaptan addieren. Die Methode ist somit eine wichtige Ergänzung zur spezifischen Bestimmung gewisser Doppelbindungen und zwar gerade solcher, die schwierig Halogen addieren.

Tabelle 10. *Bestimmung von Doppelbindungen durch Mercaptanaddition (Dodecylmercaptan)*

Optimale Bedingungen	% Mercaptan-überschuß	Reaktionszeit (min)
Acrylnitril, Acrylamid, Acrylsäure-, Maleinsäureester, Vinylsulfonsäureester	25—100	2—5
Methacryl-, Crotonsäureester	100—150	10—15
Ketone	200—400	20—30

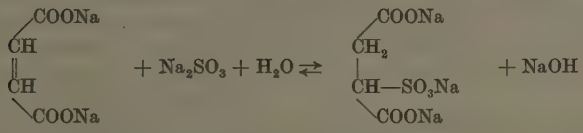
R · SH-Addition an folgenden Gruppierungen:



4. Sulfitmethode

Die *Addition von Sulfit* bzw. *Hydrogensulfit* an ungesättigte Verbindungen wurde von WURZSCHMITT[39] zu einer Methode der quantitativen

Tabelle 11. *Bestimmung von Doppelbindungen durch Addition von Sulfit*



Die Methode eignet sich zur Bestimmung von:
Maleinsäure (neben Fumarsäure)
Maleinsäure + Fumarsäure (modifiziert)
Malein- und Fumarsäurediäthylester
Acrylsäure, Crotonsäure
Acrylsäureester, Methacrylsäureester
Acrylnitril
Crotonaldehyd

Bestimmung gewisser aliphatischer Doppelbindungen ausgearbeitet, insbesondere zur Bestimmung von Malein- bzw. Fumarsäure. Die Anlagerung von Natriumsulfit an die Doppelbindung des Na-Maleinats vollzieht sich nach der in Tab. 11 wiedergegebenen Gleichung unter Bildung von sulfobernsteinsaurem Natrium und Natriumhydroxyd, das unter Verschiebung des Reaktionsgleichgewichtes titriert wird.

Die Methode von Wurzschmitt wurde von Critchfield u. Johnson[8] modifiziert. Der aus Tab. 11 zu ersehende Anwendungsbereich der Methode entspricht etwa dem der Mercaptanmethode insofern, als auch solche Verbindungen erfaßt werden, die schwierig Halogen addieren.

5. Hydrierungsmethode

Die Bestimmung der Doppelbindung durch katalytische Hydrierung ist eine Methode, die am ehesten darauf Anspruch hat, allgemein anwendbar zu sein. Die Methode ist praktisch frei von Störungen durch Substitutionsreaktionen, Oxydationsvorgänge, durch sterische Hinderung oder Hinderung durch Substituenteneinflüsse. Abgesehen von der Wahl des Katalysators und des Lösungsmittels müssen die Reaktionsbedingungen nicht empirisch festgelegt werden, wie dies vielfach bei anderen Additionsreaktionen der Fall ist. Der Bestimmung der Doppelbindung durch Hydrierung liegen 2 Prinzipien zugrunde: die *volumetrische* Messung des Wasserstoffverbrauches bei konstantem Druck in einer Gasbürette oder die *manometrische* Messung der Druckabnahme, die bei konstantem Volumen durch den Wasserstoffverbrauch eintritt. Auf dem Prinzip der volumetrischen Messung des Wasserstoffverbrauches beruhen die meisten im analytischen Laboratorium gebräuchlichen Hydrierungsapparaturen, z. B. die Halbmikroapparatur von Kaufmann u. Baltes[18], die der Einheitsmethode der DFG (1953) zugrunde liegt, oder die Mikroapparatur von Schöniger-Soltys[30]. Wir verwenden eine von Wurzschmitt u. Kerkow modifizierte Apparatur nach Kaufmann u. Baltes und hydrieren gewöhnlich bei Zimmertemperatur unter Verwendung von Einwaagen von etwa 100 mg. Abb. 1 zeigt das Schema dieser Apparatur.

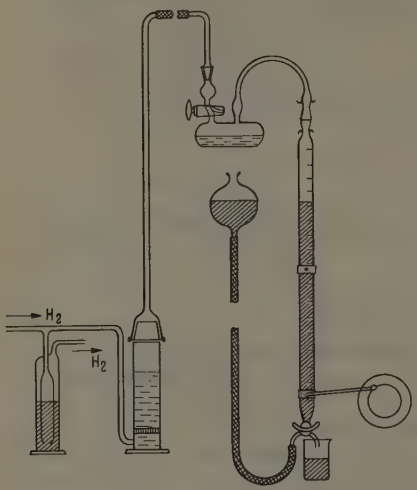


Abb. 1. Hydrierungsapparatur

Der Verlauf der Hydrierung wird durch das *Lösungsmittel* und den *Katalysator* entscheidend beeinflußt; Voraussetzung ist die Verwendung von Wasserstoff höchster Reinheit, am besten von Elektrolytwasserstoff, der durch alkalische Plumbitlösung geleitet wurde.

Das *Lösungsmittel* darf selbst keinen Wasserstoff verbrauchen, kein Katalysatorgift enthalten und soll keinen hohen Dampfdruck besitzen. Diese Voraussetzungen treffen auf Eisessig zu, der deshalb auch fast ausschließlich verwendet wird.

Als Katalysator verwenden wir den *Adams'schen* PtO_2-*Katalysator* (und zwar relativ große Mengen), der vor der eigentlichen Hydrierung zu fein verteiltem Pt reduziert wird, und einen $Pd/BaSO_4$-*Katalysator*. Die Beschränkung auf zwei in ihrer Wirksamkeit verschiedene und bekannte Katalysatoren halten wir für ausreichend. Der Unterschied zwischen diesen beiden Katalysatoren liegt vorwiegend darin, daß der aggressivere Pt-Katalysator neben der aliphatischen Doppelbindung auch aromatische Kerne hydriert, während der Pd-Katalysator nur die aliphatische Doppelbindung und keine aromatischen Kerne hydriert. Beide Katalysatoren können allerdings auch andere hydrierbare Gruppen, z. B. die Nitrilgruppe, hydrieren.

Tab. 12 zeigt die Ergebnisse, die bei der Hydrierung ausgewählter, typischer ungesättigter Verbindungen mit Pt- und mit Pd-Katalysator erhalten wurden:

Aliphatische ungesättigte Kohlenwasserstoffe lassen sich in Gegenwart des Pt-Katalysators und auch des Pd-Katalysators quantitativ hydrieren; bei Styrol erhält man mit Pt-Katalysator 4 Doppelbindungen, mit Pd-Katalysator erwartungsgemäß nur 1 Doppelbindung.

Ungesättigte, rein aliphatische Säuren und Ester werden in Gegenwart beider Katalysatoren genau quantitativ hydriert; die Hydrierung ist so gut reproduzierbar und genau, daß die Hydriermethode eine zuverlässige Bestimmungsmethode für Acrylsäureester darstellt. Zimtsäure gibt wiederum erwartungsgemäß mit Pt 4 Doppelbindungen, mit Pd 1 Doppelbindung und zwar recht genau.

Ungesättigte Alkohole und Aldehyde werden in Gegenwart von Pt meist überhydriert; in Gegenwart von Pd verläuft dagegen die Hydrierung quantitativ nur an der Doppelbindung. Am Beispiel des Butendiols zeigt sich, daß in Eisessig 1 OH-Gruppe zusätzlich zur Doppelbindung unter Bildung von nachgewiesenem n-Butanol hydriert wird. Unter Verwendung von Wasser als Lösungsmittel wird mit Pt nur die Doppelbindung hydriert, ein Beispiel dafür, daß die Wahl des Lösungsmittels das Ergebnis der Hydrierung beeinflussen kann. Bei ungesättigten Aldehyden und Alkoholen ist auf jeden Fall die Hydrierung mit Pd derjenigen mit Pt vorzuziehen. Ein komplizierterer Alkohol wie Linalool wird mit Pd genau an beiden Doppelbindungen hydriert.

Die Doppelbindung der Amide der Acryl- und Methacrylsäure wird, besonders mit Pd, sehr genau erfaßt, auch diejenige des Methylolmethacrylamids.

Acrylnitril und *Methacrylnitril* geben mit beiden Katalysatoren einen H_2-Verbrauch, der genau 3 Doppelbindungen entspricht, d. h. die Nitrilgruppe wird quantitativ mithydriert.

N-Vinylverbindungen, wie Vinylcaprolactam und Vinylpyrrolidon lassen sich ebenfalls durch Hydrierung, besonders mit Pt, gut bestimmen. Die Hydriermethode mit Pd erwies sich bei *N-Vinylimidazol* von allen versuchten Methoden als einzige zur Gehaltsbestimmung geeignet.

Tabelle 12. *Bestimmung der Doppelbindung durch katalytische Hydrierung*

Lösungsmittel: Eisessig	Katalysator: Pt nach Adams gef.	Katalysator: $Pd/BaSO_4$ gef.
Diisobutylen	1,01	—
Styrol	4,00	1,01
Benzol	2,95	0,02
Butendiol	2,01 (in W. 1,00)	0,96
Linalool	—	2,00
Acrolein	1,2—1,4	0,99
Acrylsäure	1,00	0,97
Acrylsäuremethylester	0,99	0,99
Acrylsäureäthylester	0,99	0,99
Crotonsäure	0,98	—
Maleinsäure	1,01	1,00
Fumarsäure	1,00	1,01
Ölsäure	1,02	1,03
Zimtsäure	3,98	1,01
Benzoesäure	3,01	0,00
Acrylamid	0,98	1,00
Methacrylamid	1,03	0,99
Methylolmethacrylamid	1,08	1,01
Acrylnitril	3,02	2,99
Methacrylnitril	—	2,98
N-Vinylimidazol	—	1,00
N-Vinylpyrrolidon	1,00	(0,96)
N-Vinylcaprolactam	1,00	(0,91)

Diese Ergebnisse wurden mit Einwaagen von etwa 100 mg erzielt. Praktisch die gleichen Ergebnisse mit denselben Verbindungen wurden unter Verwendung der Mikroapparatur von Soltys-Schöniger bei Einwaagen von 3—5 mg erzielt.

Die Hydrierung ist nach unseren Erfahrungen von allen untersuchten Methoden zur Bestimmung der Doppelbindungen die universellste; bei nur wenigen Verbindungstypen, wie Vinylestern, erwies sie sich nicht zur quantitativen Bestimmung geeignet.

II. Bestimmung der Kohlenstoff-Dreifachbindung

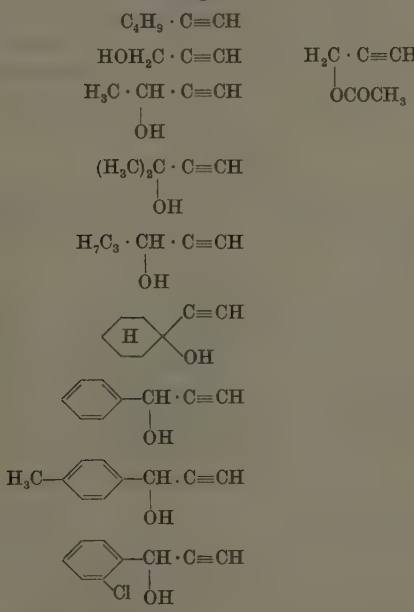
1. Acetylenderivate mit endständiger Dreifachbindung

Die meisten Methoden zur Bestimmung von Acetylen und seinen Derivaten, die ein saures H-Atom besitzen, beruhen auf der Acetylidbildung. Man läßt solche Verbindungen in gelöster Form mit Schwermetallsalzen, meist Ag-Salzen, reagieren und bestimmt z. B. den Ag-Überschuß oder die bei der Reaktion freiwerdende Säure, z. B. die Essigsäure, Benzoesäure oder Salpetersäure, je nachdem, welches Salz zur Anwendung kommt.

Tabelle 13. *Bestimmung von Acetylenderivaten durch die Silberbenzoatmethode* (Marszak u. Koulkes)

$$2R \cdot C \equiv CH + 3C_6H_5COOAg \rightarrow 2R \cdot C \equiv CAg \cdot C_6H_5COOAg + 2C_6H_5 \cdot COOH$$

Die Methode eignet sich zur Bestimmung von:



Die Methode von Marszak u. Koulkes[23] beruht auf der Reaktion von Silberbenzoat mit dem in Wasser, Alkohol oder wäßrigem Alkohol gelösten Acetylenderivat und der Titration der freiwerdenden Benzoesäure nach Entfernung des überschüssigen Ag^+.

Tab. 13 zeigt die Reaktionsgleichung und diejenigen Acetylenderivate, die mit Hilfe dieser Methode bestimmt werden konnten. Nach unseren

Erfahrungen ist die Methode gut geeignet für Phenyläthinylcarbinol. Die Werte für Butin-1-ol-3 und Propargylalkohol waren zwar reproduzierbar, lagen jedoch etwas zu niedrig. Die an sich brauchbare Methode hat den Nachteil, daß der Silberacetylidniederschlag abfiltriert und sorgfältig ausgewaschen werden muß. Weiterhin scheinen die Werte von der Alkoholkonzentration des Reaktionsmediums abzuhängen, dessen günstigste Zusammensetzung gegebenenfalls zu ermitteln ist; diese Erfahrung machten wir besonders bei Phenyläthinylcarbinol, das am besten in Wasser als Lösungsmittel zu bestimmen ist, und bei o- und p-Chlorphenyläthinylcarbinol, die in 50 bzw. 75%igem Alkohol am besten zu bestimmen sind.

Die vielseitigste und einfachste Methode zur Bestimmung von Acetylenderivaten mit saurem H-Atom ist die Methode von Barnes u. Molinini[2]. Die Methode beruht auf der Bildung eines von Shaw u. Fisher[31] gefundenen löslichen Doppelsalzes aus Silberacetylid und 6 Mol $AgNO_3$ und dem Freiwerden titrierbarer Salpetersäure, wenn das Acetylenderivat mit einer *konzentrierten* $AgNO_3$-Lösung behandelt wird.

Tabelle 14. *Bestimmung von Acetylenderivaten durch Reaktion mit konzentrierter $AgNO_3$-Lösung*
(Barnes u. Molinini)

$$HC \equiv CH + 8\,AgNO_3 \rightarrow AgC \equiv CAg \cdot 6\,AgNO_3 + 2\,HNO_3$$
$$R \cdot C \equiv CH + 7\,AgNO_3 \rightarrow R \cdot C \equiv CAg \cdot 6\,AgNO_3 + 2\,HNO_3$$

Es lassen sich bestimmen:

Acetylen	Propargylalkohol
Propin-1	Phenyläthinylcarbinol
2-Methylbutenin	3-Methylbutin-1-ol-3
Hexin-1	3,4-Dimethylpentin-1-ol-3
Butin-1	3-Äthylpentin-1-ol-3
Propiolsäure	3-Methylhexin-1-ol-3
3-Aminopropin	3-Methylnonin-1-ol-3
	Äthinylcyclohexanol
	Äthinylcyclopentanol

In Tab. 14 sind die Reaktionsgleichungen und eine Anzahl von Verbindungen wiedergegeben, die durch diese Methode genau und reproduzierbar bestimmt werden können. Die Methode ist besonders einfach und schnell zu handhaben, da kein Niederschlag entsteht, der abzufiltrieren und auszuwaschen ist. Als Nachteil erscheint lediglich der hohe Verbrauch an $AgNO_3$, der jedoch bei Serienanalysen durch den Zeitgewinn ausgeglichen wird.

Methoden, die auf der Verwendung von *Silberacetat* beruhen, scheinen nur in speziellen Fällen für Acetylenderivate mit nicht zu kleinem Mol.-Gewicht geeignet zu sein.

Weitere auf Acetylidbildung beruhende Methoden verwenden *Kupfer(I)-salze*, z. B. die bekannte titrimetrische Acetylenbestimmungsmethode von Willstätter u. Maschmann[37]. Als Reagens dient das Ilosvay-Reagens, also eine durch Reduktion von Kupfer(II)-salz mit Hydroxylamin hergestellte Kupfer(I)-salzlösung.

Acetylen*spuren* lassen sich nach kolloidaler Ausfällung durch Ilosvay-Reagens in Gegenwart eines Schutzkolloids, wie Tylose oder Gelatine, colorimetrisch oder photometrisch genau bestimmen.

Neben Silber- und Kupfer(I)-salzen dienen auch *Quecksilber(II)-salze* zur Bestimmung von Acetylenderivaten. Hierher gehört z. B. die titrimetrische Methode von Hanna u. Siggia[10], der folgende Reaktionsgleichung zugrunde liegt:

$$2\,R \cdot C \equiv CH + K_2HgJ_4 + 2\,KOH \rightarrow (R \cdot C \equiv C)_2Hg + 4\,KJ + 2\,H_2O.$$

In der praktischen Ausführung wird das Reagens, eine Lösung von HgJ_2 in KJ-Lösung, zunächst mit Methanol versetzt. Dann fügt man die Probe und eine gemessene Menge 0,5 n KOH-Lösung hinzu und titriert den Verbrauch der letzteren mit Säure. Die Methode eignet sich unter anderem auch zur Bestimmung von Äthinylcyclohexanol und Phenyläthinylcarbinol.

Wegen ihres sauren H-Atoms reagieren Acetylenderivate mit endständiger Dreifachbindung auch mit Methyl-Mg-Jodid nach Grignard eine Reaktion, die von englischen Chemikern[15] näher untersucht wurde. Die Reaktion verläuft allerdings bei manchen Acetylenderivaten, z. B. Phenyläthinylcarbinol, erst bei 90° C quantitativ. Bei Verbindungen, welche eine Doppelbindung und eine Dreifachbindung in Konjugation besitzen, z. B. Methylpenten-2-in-4-ol-1, verläuft die Reaktion auch bei niedriger Temperatur quantitativ. Von Interesse wäre, ob sich die Alanatmethode von Merz[28] zur Bestimmung des aktiven H auch zur Bestimmung von endständigen Dreifachbindungen eignet.

2. Acetylenderivate mit nicht endständiger Dreifachbindung

Bei Acetylenderivaten, die keine endständige Dreifachbindung besitzen, sind die bisher angeführten Methoden nicht anwendbar. Für solche Verbindungen sind nur wenige Möglichkeiten vorhanden, und zwar:

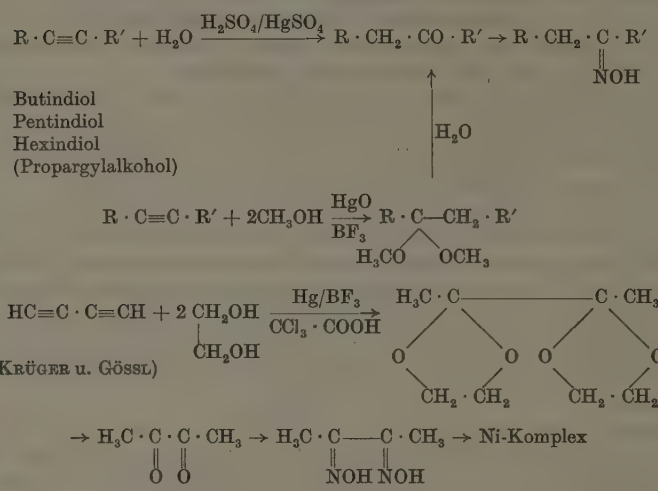
Eine gravimetrische Bestimmung über unlösliche Hg-Verbindungen unbekannter Konstitution, so daß empirische Umrechnungsfaktoren zu verwenden sind;

die katalytische Anlagerung von Wasser oder einem Alkohol zu einem Keton bzw. einem Ketal, die durch Carbonylbestimmungsmethoden (bei Ketalen nach Hydrolyse) bestimmt werden können;

die Anlagerung von Halogen oder Wasserstoff.

a) Hydrationsmethode. Zunächst sei die einzige allgemein anwendbare Methode, die katalytische Anlagerung von Wasser bzw. einem Alkohol, kurz besprochen.

Tabelle 15. *Bestimmung von Acetylenderivaten* $R \cdot C \equiv C \cdot R'$



Aus Tab. 15 sind die Reaktionsgleichungen von Ausführungsformen (Siggia[32]; Wagner, Goldstein u. Peters[35]; Krüger u. Gössl[20]) dieses Prinzips zu ersehen.

Uns interessierten diese Methoden besonders hinsichtlich einer Bestimmungsmöglichkeit von *Butindiol-1,4*. Butindiol-1,4 lagert in wäßrig-methanolischer Lösung in Gegenwart des von Siggia[32] vorgeschlagenen Katalysators ($HgSO_4$ in verd. Schwefelsäure) bei 40° C in 1 Std quantitativ Wasser zu Ketobutandiol an. Die Oximierung des Ketobutandiols in der neutralisierten Lösung in Gegenwart des Hg^{2+} erfolgt bei Zimmertemperatur mit $NH_2OH \cdot HCl$ größtenteils augenblicklich, der verbleibende kleine Rest wird nach 15 min Stehenlassen quantitativ oximiert. Als Indicator für die Titration der bei der Oximierung freiwerdenden Salzsäure dient Bromphenolblau.

Bei der Übertragung der für Butindiol günstigen Bedingungen von 1 Std/40° C auf andere Verbindungen ergab sich, daß diese Bedingungen für *Propargylalkohol, 2-Methylpentin-3-diol-2,5, Hexindiol* und *3-Methylhexin-4-diol-3,6* nicht ausreichend sind. Diese Verbindungen müssen zur quantitativen Wasseranlagerung zum entsprechenden Keton 1 Std am Rückfluß erhitzt werden.

b) Hydrierungsmethode. Die bei der Bestimmung von Doppelbindungen besonders bewährte katalytische Hydrierung versagt im allgemeinen bei der Bestimmung der Dreifachbindung. Tab. 16 zeigt Ergebnisse, die bei der Hydrierung einiger Acetylenalkohole mit Pt- bzw. Pd-Katalysator von uns erhalten wurden:

Tabelle 16. *Hydrierung von Acetylenalkoholen*

	ber. JZ	gef. JZ		gef. JZ	
	je 1 ⌐̄	(Pt-Kat.)	n ⌐̄	(Pd-Kat.)	n ⌐̄
Propargylalkohol	453	1015	2,24	815	1,80
Butin-2-diol-1,4	295	882	2,99	713	2,42
2-Methylpentin-3-diol-2,5	222	654	2,95	581	2,62
3-Methylhexin-4-diol-3,6	198	576	2,91	540	2,73
2,5-Dimethylhexin-3-diol-2,5	178,5	488	2,74	463	2,60
3,6-Dimethyloctin-4-diol-3,6	149	408	2,74	398	2,67
Äthinylcyclohexanol	204	422	2,07	410	2,01

Mit Ausnahme des Äthinylcyclohexanols gab keine der geprüften Acetylenalkohole eine 2 Doppelbindungen (= 1 Dreifachbindung) entsprechende Hydrierjodzahl.

Die bei der Hydrierung von aliphatischen Doppelbindungen besonders günstige Hydrierung mit $Pd/BaSO_4$-Katalysator gab, mit Ausnahme des Äthinylcyclohexanols, keine Hydrierjodzahl, die einem ganzzahligen Vielfachen der für 1 Doppelbindung berechneten Hydrierjodzahl entspricht.

Mit Pt-Katalysator wird bei Butindiol und Methylpentindiol ziemlich genau die für 3 Doppelbindungen berechnete Hydrierjodzahl gefunden; dies spricht dafür, daß neben der Hydrierung der Dreifachbindung auch eine Hydrierung der OH-Gruppe stattfindet, was auch präparativ durch Isolierung von n-Butanol bewiesen wurde.

c) Halogenadditionsmethoden. Die zur Bestimmung von Doppelbindungen wichtigen Halogenadditionsmethoden sind im allgemeinen zur Bestimmung von Dreifachbindungen nicht geeignet. *Bromadditionen* verlaufen bei vielen Acetylenderivaten nicht in stöchiometrisch ganzzahligen Verhältnissen. Als Ausnahme fanden wir jedoch *Hexadiindiol*, das bei der Bromierung mit nascierendem Brom aus Bromid/Bromat eine genau 2 Doppelbindungen entsprechende Jodzahl ergab. Nach YAMAMOTO u. Mitarb.[40] läßt sich Propargylalkohol durch Einwirkung überschüssiger Jodlösung in wäßrig-alkalischer Lösung und Rücktitration des Jodüberschusses bestimmen. Acetylenderivate, die keine endständige Dreifachbindung besitzen und für die wir eine einfache Bestimmungsmethode suchten (z. B. die in Tab. 16 angeführten Acetylendiole),

reagierten jedoch nicht mit Jod. Die Jodmethode scheint auf Acetylenderivate mit endständiger Dreifachbindung beschränkt zu sein, da sich z. B. auch Äthinylcyclohexanol und Methylbutinol bestimmen ließen. Die Reaktion mit Jod ist wahrscheinlich keine Additionsreaktion, sondern eine Substitutionsreaktion, die nach folgender Gleichung verläuft:

$$R \cdot C \equiv CH + J_2 \rightarrow R \cdot C \equiv C \cdot J + HJ\,.$$

Zusammenfassung

Für Verbindungen mit *Doppelbindungen* stehen eine Anzahl brauchbarer chemischer Methoden zur Verfügung, die es gestatten, praktisch jede ungesättigte Verbindung durch eine oder mehrere Methoden zu bestimmen. Diese Methoden sind meist auch auf die Bestimmung des sogenannten Monomerenanteils in Polymeren anwendbar, wenn ein geeignetes Lösungsmittel zur Verfügung steht. Durch Kombination mehrerer relativ spezifischer Methoden ist es in vielen Fällen auch möglich, Gemische ungesättigter Verbindungen zu bestimmen. Die katalytische Hydrierung mit $Pd/BaSO_4$ erscheint uns die einzige einfach zu handhabende Methode zu sein, welche die Gesamtheit aller Doppelbindungen erfaßt.

Die wichtigste, allgemein anwendbare chemische Methode zur Bestimmung von *Acetylenderivaten*, die ein saures H-Atom besitzen, ist die $AgNO_3$-Methode von Barnes u. Molinini; daneben sind einige andere Methoden mehr oder minder gut geeignet. Für Acetylenderivate, die keine endständige Dreifachbindung enthalten, kommt im allgemeinen nur die Methode der Oximierung nach katalytischer Wasseranlagerung in Frage, bei der allerdings die Reaktionsbedingungen von Fall zu Fall festgelegt werden müssen.

Literatur

[1] Albertson, C. E., u. J. A. MacGregor: Analyt. Chemistry **22**, 806 (1950). — [2] Barnes jr., L., u. L. J. Molinini: Analyt. Chemistry **27**, 1025 (1955); vgl. diese Z. **152**, 301 (1956). — [3] Beesing, D. W., W. P. Tyler, D. M. Kurtz u. S. A. Harrison: Analyt. Chemistry **21**, 1073 (1949); vgl. diese Z. **131**, 296 (1950). — [4] Braae, B.: Analyt. Chemistry **21**, 1461 (1949); vgl. diese Z. **132**, 307 (1951). — [5] Buděšínský, B.: Chem. Listy **51**, 259 (1957); vgl. diese Z. **158**, 223 (1957). — [6] Byrne, R. E., u. J. B. Johnson: Analyt. Chemistry **28**, 126 (1956); vgl. diese Z. **154**, 58 (1957). — [7] Critchfield, F. E.: Analyt. Chemistry **31**, 1406 (1959); vgl. diese Z. **174**, 289 (1960). — [8] Critchfield, F. E., u. J. B. Johnson: Analyt. Chemistry **28**, 73 (1956); vgl. diese Z. **153**, 299 (1956). — [9] Dubois, H. D., u. D. A. Skoog: Analyt. Chemistry **20**, 624 (1948). — [10] Hanna, J. G., u. S. Siggia: Analyt. Chemistry **21**, 1469 (1949); vgl. diese Z. **131**, 381 (1950). — [11] Hanuš, J.: Z. Unters. Nahrungs- u. Genußmittel **4**, 913 (1901). — [12] Huber, W.: Mikrochim. Acta (Wien) **1960**, 44. — [13] Hübl, B. v.: Dinglers polytechn. J. **253**, 281 (1884). — [14] Johnson, J. B., u. J. P. Fletcher: Analyt. Chemistry **31**, 1563 (1959); vgl. diese Z. **175**, 68 (1960). — [15] Jones, E. R. H., u. J. T. McCombie: J. chem. Soc. (London) **1942**, 733. — Cymerman, J., J. M. Heilbron u. E. R. H. Jones: J. chem. Soc. (London)

1945, 90. — [16] Kaufmann, H. P.: Z. Unters. Lebensmittel **51**, 3 (1926); vgl. diese Z. **75**, 472 (1928). — [17] Kaufmann, H. P.: Z. Unters. Lebensmittel **51**, 15 (1926); vgl. diese Z. **70**, 77 (1927). — [18] Kaufmann, H. P., u. J. Baltes: Ber. dtsch. chem. Ges. **70**, 2537 (1938). — [19] Kaufmann, H. P., u. H. Grosse-Oetringhaus: Ber. dtsch. chem. Ges. **70**, 911 (1937); vgl. diese Z. **120**, 275 (1940). — [20] Krüger R. u. Th. Gössl: Angew. Chem. **65**, 557 (1953); vgl. diese Z. **143**, 66 (1954). — [21] Lucas, H. J., u. D. Pressman: Ind. Engng. Chem. anal. Edit. **10**, 140 (1938); vgl. diese Z. **127**, 52 (1944). — [22] McIlhiney P. C.: J. Amer. chem. Soc. **16**, 275 (1894); **21**, 1084 (1899). — [23] Mallik K. L. u. M. N. Das: Chem. and Ind. **1959**, 162; vgl. diese Z. **169**, 383 (1959). — [24] Margosches B. M., W. Hinner u. L. Friedmann: Angew. Chem. **37**, 334, 982 (1924); vgl. diese Z. **72**, 64 (1927). — [25] Marquard, R. P., u. E. N. Luce: Analyt. Chemistry **20**, 751 (1948); **21**, 1194 (1949); vgl. diese Z. **132**, 308 (1951). — [26] Marszak, J., u. M. Koulkes: Bull. Soc. chim. France (5) **17**, 364 (1950); vgl. diese Z. **132**, 189 (1951). — [27] Martin, R. W.: Analyt. Chemistry **21**, 921 (1949); vgl. diese Z. **139**, 61 (1950). — [28] Merz, W.: diese Z. **181**, 147 (1961). — [29] Rosenmund, K. W., u. W. Kuhnhenn: Z. Unters. Nahrungs- u. Genußmittel **46**, 154 (1923); vgl. diese Z. **72**, 168 (1927). — [30] Schöniger, W.: Mikrochem. verein. Mikrochim. Acta **38**, 132 (1951). — [31] Shaw, J. A., u. E. Fisher: J. Amer. chem. Soc. **68**, 2745 (1946). — [32] Siggia, S.: Analyt. Chemistry **28**, 481 (1956); vgl. diese Z. **157**, 39 (1957). — [33] Siggia, S., u. R. L. Edsberg: Analyt. Chemistry **20**, 762 (1948). — [34] Tausz, J.: Angew. Chem. **32**, I 233 (1919). — [35] Wagner, Ch. D., Th. Goldstein u. E. D. Peters: Analyt. Chemistry **19**, 103 (1947). — [36] Wijs, J. J. A.: Ber. dtsch. chem. Ges. **31**, 750 (1898). — [37] Willstätter, R., u. E. Maschmann: Ber. dtsch. chem. Ges. **53**, 939 (1920); vgl. diese Z. **61**, 191 (1922). — [38] Winkler, L. W.: Z. Unters. Nahrungs- u. Genußmittel **28**, 65 (1914); **43**, 201 (1922); DAB 6. — [39] Wurzschmitt, B.: diese Z. **128**, 549 (1948). — [40] Yamamoto, K., M. Yoshimura u. M. Tonaka: Bull. chem. Soc. Japan **24**, 151 (1951).

Dr. K. Müller, Badische Anilin- und Sodafabrik A.G., Ludwigshafen/Rhein

---

Untersuchungslaboratorium der Badischen Anilin- u. Sodafabrik A.G., Ludwigshafen/Rhein

Beitrag zur Mikrobestimmung des aktiven Wasserstoffs

Von

Wolfgang Merz

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 26. Oktober 1960)

Die Bestimmung des sogenannten aktiven Wasserstoffs geht auf eine Beobachtung von Tschugaeff[20] zurück, der 1902 in einer Versuchsreihe feststellte, daß Alkylmagnesiumhalogenide mit Carboxyl- und auch Hydroxylgruppen unter Gasentwicklung reagieren.

Zerewitinoff[22] wies kurze Zeit darauf nach, daß bei dieser Reaktion gemäß der Gleichung

$$CH_3MgJ + RH \rightarrow CH_4 + RMgJ$$

die entsprechenden gesätt. Kohlenwasserstoffe entstehen und wertete diese Umsetzung mit dem Grignard-Reagens zu einer gasanalytischen Bestimmung der beiden genannten Gruppen aus.

Aber nicht nur Substanzen mit Carboxyl- oder Hydroxylgruppen, sondern auch solche mit Sulfhydryl-, Amino- oder Amidogruppen reagieren mit Methylmagnesiumjodid unter Freisetzung von Methan. Ebenso reagieren monosubstituierte Acetylene, Sulfonsäuren und Wasser, demnach alle Substanzen, die Gruppen mit aktiven Wasserstoffatomen enthalten. Dabei reagieren im allgemeinen Amine und Amide sowie Wasser unter Bildung von 2 Molekeln Gas, während alle anderen Gruppen nur 1 abspaltbares H-Atom enthalten. Das Methylmagnesiumjodid reagiert ferner mit verschiedenen funktionellen Gruppen, z.B. Aldehyd-, Keto- Nitril- oder Estergruppen unter Bildung von „Additionsverbindungen", also ohne Freisetzung von Methan. Eine Gehaltsbestimmung dieser Gruppen ist durch Bestimmung des bei der Additionsreaktion nicht verbrauchten Reagenses mit Anilin z.B. möglich. Das Hauptinteresse galt jedoch der quantitativen Bestimmung der aktiven Wasserstoffatome, was auch die große Zahl von Arbeiten[7], die die Anwendung dieser Methode im Makro- und Halbmikromaßstab beschrieben, erklärt.

Im Prinzip handelt es sich hierbei jedoch nur um rein apparative Modifikationen, die die der Methode anhaftenden kleinen Fehler nicht beseitigten. Diese sich zum Teil kompensierenden Fehler fielen bei der Makromethode auch kaum ins Gewicht, verurteilten jedoch jede Mikromethode zum Scheitern.

Diesen Schwierigkeiten, die insbesondere durch die Reaktionsfreudigkeit des Grignard-Reagenses mit dem Sauerstoff der Luft wie auch der Feuchtigkeit hervorgerufen werden, wurden sowohl ROTH[15] als auch SOLTYS[18] am besten gerecht. Beide Autoren übertrugen die Methode durch Konstruktion geeigneter Apparaturen sowie Festlegung entsprechender Arbeitsbedingungen in den Mikromaßstab und konnten in vielen Fällen sehr exakte Werte erzielen. Dabei müssen die Apparaturen und Reagentien vollkommen trocken sein. Die zu untersuchende Substanz wird in einem geeigneten Lösungsmittel, meist Anisol oder Pyridin, gelöst und durch Anwendung eines indifferenten Gases unter Ausschluß von Luftsauerstoff mit Methylmagnesiumjodid zur Reaktion gebracht. Dies geschieht nötigenfalls auch bei erhöhter Temperatur (Heißwert). Das freigesetzte Methan wird in einer Gasbürette über Quecksilber gemessen. EVANS, DAVENPORT u. REVUKAS[3] leiten das entstehende Methan in eine Verbrennungsapparatur und wägen das gebildete H_2O und CO_2. TERENT'EV, ČERBAKOVA u. KREMENSKAJA[19] verdrängen zuerst die Luft aus der Apparatur mit Kohlensäure und treiben nach der Reaktion das Methan-Kohlendioxydgemisch in ein Azometer, wo das Methan analog der Dumas-Bestimmung über Kalilauge gemessen wird. Während aber sowohl bei

Soltys[18] als auch bei Roth[15] durch Bestimmung des verbrauchten Reagenses auch eine eventuelle „Additionsreaktion" erfaßt werden kann, ist dies hier nicht möglich, da ja die Kohlensäure mit dem Grignard-Reagens reagiert. Auf weitere rein apparative Modifikationen soll hier nicht eingegangen werden.

Diese bis jetzt beschriebene Methode unter Verwendung von Methylmagnesiumjodid ist jedoch trotz ihrer technischen Vervollkommnung mit einigen prinzipiellen Nachteilen behaftet, die oft größere Fehler bedingen. So ist die Reaktionsfähigkeit des Grignard-Reagenses mit aktiven Wasserstoffatomen nicht sehr groß und zudem stark abhängig von der Stellung der funktionellen Gruppe und der anderer Substituenten in der Molekel. Aus diesem Grunde arbeitet man ja nicht nur bei Raum-, sondern auch bei erhöhter Temperatur. Dabei muß aber stets mit Nebenreaktionen gerechnet werden, die sehr häufig zu einer Gasentwicklung führen. Sind Nitrogruppen am Aufbau der Molekel beteiligt, so stören diese die Grignard-Reaktion sehr häufig, beim Erwärmen jedoch in jedem Falle. Lehman u. Basch[9] stellten bei höheren Temperaturen auch eine Absorption von Methan in Pyridin fest. Auch die komplizierte Darstellung, ebenso wie die schlechte Lagerbeständigkeit von Methylmagnesiumjodid führten letzlich dazu, dieses Reagens weitgehend durch das 1946 von Finholt, Bond u. Schlesinger[4] dargestellte Lithiumalanat zu ersetzen.

Das Lithiumaluminiumhydrid ($Li[AlH_4]$) hat nach den grundlegenden Arbeiten von Brown u. Nystrom[11,12] sowie Hochstein[6] eine allgemeine Anwendung als Reduktionsmittel in der organischen Chemie gefunden. Auch für analytische Untersuchungen gewann es ständig an Interesse. Krynitsky, Johnson u. Carhart[8] stellten quantitative Untersuchungen über die Einwirkung des Alanats auf Substanzen mit aktiven Wasserstoffatomen an. Das Lithiumaluminiumhydrid reagiert dabei nach der Gleichung

$$LiAlH_4 + 4\,RH \rightarrow LiAlR_4 + 4\,H_2$$

unter Bildung von Wasserstoff, der von Krynitsky u. Mitarb.[8] durch Messung der Druckzunahme in einer speziell entwickelten Apparatur bestimmt wird. Zaugg u. Horrom[21] haben bei einer großen Zahl von Verbindungen die Wirkung des Lithiumalanats mit der des Methylmagnesiumjodids verglichen und dabei vor allem festgestellt, daß das Alanat wesentlich rascher reagiert, was insbesondere zur Untersuchung enolischer Gruppen von großer Bedeutung ist. Auch bei der Bestimmung des aktiven Wasserstoffs in sterisch behinderten Atomgruppen ist das Alanat dem Grignard-Reagens überlegen. Andererseits ist aber zu beachten, daß das Lithiumaluminiumhydrid zufolge seiner hohen Reduktionskraft Nitrogruppen, Ester, Aldehyde, Ketone, Säureanhydride sowie Säurechloride reduziert. So haben auch Brown u. Mitarb.[2] das Lithium oder Natriumborhydrid als wesentlich trägere Reduktionsmittel vorgeschlagen.

Nach Arbeiten von LIEB u. SCHÖNIGER[10] sowie RAO u. Mitarb.[14] können die von ROTH[15] bzw. von SOLTYS[18] für die Reaktion mit dem Grignard-Reagens entwickelten Apparaturen in gleicher Weise auch für die Bestimmung des aktiven Wasserstoffs mit Lithiumalanat verwendet werden. Daneben kann der gebildete Wasserstoff manometrisch gemessen oder aber nach SCHÖNIGER[17] zu Wasser verbrannt und dieses über Kohlenoxid jodometrisch bestimmt werden.

Einer allgemeinen Anwendung der Lithiumaluminiumhydridmethode stellt sich jedoch die sehr schlechte Löslichkeit des Reagenses in den meistens Lösungsmitteln entgegen. Als solche kommen neben Methyl-, Äthyl-, n-Propyl- und n-Butyläther nur noch Tetrahydrofuran, Dioxan und n-Äthylmorpholin in Frage, die jedoch schon allein wegen ihres hohen Dampfdruckes für eine exakte Mikrobestimmung nur schlecht geeignet sind (hoher Blindwert). Auch sind viele zu analysierende Substanzen in den genannten Lösungsmitteln unlöslich, wodurch die Methode noch weiter eingeschränkt wird. Die thermische Instabilität sowie die Selbstentzündlichkeit auch in Lösung waren weitere Beweggründe zur Suche nach einem geeigneteren Reagens.

Die Angaben von CANHART, BLIZZART, JOHNSON u. KRYNITSKY[1], wonach sich das Lithiumaluminiumhydrid erst oberhalb 150° C zersetzt, konnten wir nämlich mit keinem Lösungsmittel bestätigen. Wir fanden ähnliche Werte wie LIEB u. SCHÖNIGER[10], die in propylätherischer Lösung bereits bei Raumtemperatur eine merkliche Zersetzung unter Wasserstoffentwicklung beobachteten.

Wir suchten deshalb nach einem Reagens, das weder thermisch zersetzlich, noch in nichtpolaren Lösungsmitteln unlöslich war, und fanden dies auch in Form einer Reihe von Substanzen, die sich direkt vom Lithiumaluminiumhydrid ableiten. ZIEGLER[23] konnte nämlich feststellen, daß eine Substitution der Wasserstoffatome des Hydrids durch eine oder mehrere Alkylgruppen eine sehr starke Löslichkeitserhöhung, selbst in reinen Kohlenwasserstoffen, bedingt. Es handelt sich also hierbei um alkylsubstituierte Lithium-, Kalium- oder Natriumalanate, die in verdünnter Lösung völlig ungefährlich zu handhaben sind.

Eine Einführung von Oxyalkylgruppen in die Alanatmolekel, wie es SCHMITZ-DUMONT u. HABERNICKEL[16] sowie HESSE u. SCHROEDEL[5] beschreiben, führt zu noch geringerer Selbstentzündlichkeit der Substanzen, verschlechtert jedoch wieder die Löslichkeit in Kohlenwasserstoffen. So ist z.B. das von SCHMITZ-DUMONT u. HABERNICKEL[16] beschriebene Triäthoxyalanat ($Na[Al(OC_2H_5)_3H]$) nur noch in niederen Äthern löslich, in Tetrahydrofuran schlecht, in Anisol praktisch nicht mehr. Es ist jedoch ein wesentlich milderes Reduktionsmittel als das reine Lithiumalanat, was uns auch veranlaßte, es auf seine Anwendungsmöglichkeit zur Bestimmung aktiver Wasserstoffatome zu prüfen. Der Komplex läßt sich

durch Addition von Natriumhydrid an Aluminiumtriäthylat relativ leicht darstellen und wird zweckmäßigerweise in n-propyl- oder n-butylätherischer Lösung angewandt.

$$Al(OC_2H_5)_3 + NaH \rightarrow Na[Al(OC_2H_5)_3H].$$

Die Verbindung selbst ist thermisch äußerst stabil und auch nicht selbstentzündlich. Die Bestimmung aktiver Wasserstoffatome verläuft glatt, jedoch ist durch die zu verwendenden Lösungsmittel ein relativ hoher Blindwert zu berücksichtigen.

Wesentlich günstiger liegt hier der Fall bei Anwendung der Alkylkomplexe. Diese sind selbst in unpolaren Lösungsmitteln gut löslich. Eingehende Untersuchungen haben gezeigt, daß es für unsere Anwendungsbelange am zweckmäßigsten ist, alkylsubstituierte Alanate in Anisol als Lösungsmittel zu verwenden.

Sehr leicht zugängig und in seinen allgemeinen Eigenschaften, wie Zersetzlichkeit, Lösungsvermögen usw. sehr gut zur aktiven Wasserstoffbestimmung geeignet, erwies sich der Diäthylkomplex, also das *Natriumdiäthylaluminiumdihydrid*, kurz das Diäthylalanat ($Na[Al(C_2H_5)_2H_2]$). Es ist in seinem Reduktionsvermögen etwas schwächer als das Lithiumaluminiumhydrid, was jedoch durch die Möglichkeit, auch bei höherer Temperatur zu arbeiten, mehr als kompensiert wird. Die Darstellung erfolgt nach Ziegler[23] durch Umsetzung von Aluminiumdiäthylchlorid mit Natriumhydrid gemäß der Gleichung

$$Al(C_2H_5)_2Cl + 2\,NaH \rightarrow NaCl + Na[Al(C_2H_5)_2H_2].$$

Beide Ausgangsprodukte sind käuflich zu erwerben.

In meinen weiteren Ausführungen will ich nun ausschließlich die Anwendung des Dialkylkomplexes behandeln, da dieser, wie bereits erwähnt, weitestgehend unseren Anforderungen entspricht. Er ist in Kohlenwasserstoffen wie auch in stark polaren Lösungsmitteln sehr gut löslich, wobei die Möglichkeit, den Komplex z. B. in Anisol gelöst zu verwenden, für vergleichende Untersuchungen mit dem Grignard-Reagens von großer Bedeutung ist. Auf diese Weise ist es möglich, aus der verschiedenen Wirksamkeit der Reagentien auf eine bestimmte Stellung oder sterische Hinderung der funktionellen Gruppe in der Molekel zu schließen. Auch sind die meisten zu untersuchenden Substanzen in Anisol löslich, das zudem keinerlei Blindwertkorrektur bedarf. Reicht das Lösungsvermögen für Anisol nicht aus, so kann man jederzeit etwas Pyridin zumischen. In diesem Fall ist natürlich eine entsprechende Blindbestimmung auszuführen. Eine Verwendung von Pyridin als Lösungsmittel für den Komplex selbst ist jedoch nicht möglich, da hierbei eine noch nicht genau zu übersehende Reaktion eintritt. Wahrscheinlich reagiert der Komplex mit dem Pyridin unter Bildung einer Additionsverbindung

Al R_2H · Pyridin und Abscheidung von Natriumhydrid. Man kann deshalb Pyridin nur als zusätzliches Lösungsmittel für in Anisol oder auch Anethol unlösliche Substanzen verwenden. In vielen Fällen kann jedoch die Probe durch vorsichtiges Erwärmen unter Stickstoff vollkommen in Anisol gelöst werden.

Abb. 1. Apparatur zur Bestimmung des aktiven Wasserstoffs (nach SOLTYS)

Wie alle Alanate so ist auch der Diäthylkomplex äußerst luft- und feuchtigkeitsempfindlich, weshalb die von SOLTYS[18] und insbesondere von ROTH[15] angegebenen Vorsichtsmaßregeln strengstens einzuhalten sind. Wir arbeiten zudem mit gereinigtem Stickstoff, der ähnlich der Sauerstoffbestimmung nach SCHÜTZE-UNTERZAUCHER[13] von jeder Spur Sauerstoff befreit ist. Als Apparatur kann sowohl die von ROTH[15] als auch die von SOLTYS[18] zur Mikrobestimmung aktiver Wasserstoffatome beschriebene Anordnung verwendet werden. Eine genaue Beschreibung findet sich in

der Originalliteratur. Wir selbst arbeiten bevorzugt mit der Soltysschen Apparatur*, umgeben aber, wie es ROTH[15] empfiehlt, die Mikrogasbürette zur besseren Temperaturkonstanz mit einem Wassermantel (Abb. 1).

Experimentelles

Reagentien. *Natriumaluminiumdiäthyldihydrid*, Darstellung: 1 Mol Natriumhydrid wird trocken in einem Dreihalsrundkolben, in den ein Turrax-Rührer eingeführt ist, vorgelegt. Die Apparatur muß vollkommen trocken und mit Stickstoff luftfrei gespült sein. Nun gibt man etwa 50 ml Anisol und etwa 10 ml Aluminiumdiäthylchlorid hinzu. Das Anspringen der Reaktion ist an einem plötzlichen Temperaturanstieg zu erkennen. Anschließend gibt man weitere 250 ml Anisol hinzu und läßt unter öfterem Rühren das restliche Aluminiumdiäthylchlorid (insgesamt $^1/_2$ Mol) zutropfen. Die Temperatur soll dabei 60—70° C nicht übersteigen. Nötigenfalls wird der Kolben mit Schwerbenzin-Trockeneis gekühlt. Ist die Reaktion beendet, so wird durch Zentrifugieren von ausgeschiedenem Kochsalz abgetrennt.

Die Alanatlösung kann nun durch Verdünnen mit Anisol auf jede gewünschte Konzentration gebracht werden. Die Gehaltsbestimmung erfolgt dabei entweder aus einem Gaswert oder noch einfacher durch Bestimmung des Alkaliwertes nach Hydrolyse eines aliquoten Anteils mit Wasser.

Zur Vermeidung einer Verminderung des Wirkungsgrades empfiehlt es sich, die Komplexlösung unter Stickstoff aufzubewahren.

Anisol wird über Natrium abdestilliert (152,5—153° C) und über Natrium aufbewahrt.

Pyridin. Pyridin reinst, KP 115—116° C der Fa. Th. Schuchardt, München, wird über gekörntem Bariumoxyd abdestilliert.

Vaselin (rein), *Vaselin* und *Lanolin* 1:1. Zur Erzielung exakter Werte ist auf ein sorgfältiges und zweckmäßiges Fetten der Hähne zu achten: vgl. LIEB u. SCHÖNIGER[10].

Alkohol, Salzsäure. Zur Zerstörung von überschüssigem Reagens.

Aceton. Zum Trocknen der zuvor mit Chrom-Schwefelsäure und dest. Wasser gereinigten Apparatur.

Stickstoff. Reiner Bombenstickstoff wird zur quantitativen Entfernung von Spuren Sauerstoff über BTS-Katalysator der BASF-Ludwigshafen/Rh., einem Kupfermagnesiumsilicat, geleitet[17a].

Ausführung der Bestimmung. Auf die genaue Ausführung der Bestimmung des Leerwertes, wie auch der Gehaltsbestimmung selbst, möchte ich hier ebenfalls nicht näher eingehen und auf die Arbeiten von ROTH[15], SOLTYS[18] sowie LIEB u. SCHÖNIGER[10] verweisen. Die Bestimmung als solche erfolgt völlig analog, eine Modifizierung der Arbeitsweise war in keinem Falle nötig. Bei Routineanalysen arbeiten wir bei einer Einwaage von 3—5 mg mit 0,5 ml Anisol als Lösungsmittel. Sollte die Substanz auch nach Erwärmen unter Stickstoff nicht löslich sein, so empfiehlt es sich, die gleiche Menge Pyridin zuzugeben. Der Natrium-diäthylkomplex löst sich zu etwa 100—150 mg je Milliliter Anisol — das Lithiumalanat entsprechend höher — so daß die zuzugebende Menge leicht errechnet werden kann. Das Diäthylalanat reagiert nämlich, wie wir durch gaschromatographische Untersuchungen erhärten konnten, zunächst mit seinen beiden H-Atomen. Erst bei einem Überschuß von aktivierten Wasserstoffatomen reagieren auch die Alkylgruppen. Ganz allgemein kann gesagt werden, daß sich die Alkylgruppe in komplexen Aluminiumverbindungen wesentlich träger gegenüber Substanzen mit

* Diese ist komplett von Fa. Paul Haack, Wien IX, Garelligasse 4, zu beziehen.

aktiven Wasserstoffatomen verhält, als in Alanen. Der Wasserstoff dagegen ist gleichermaßen reaktionsfähig. In den Alanaten reagieren also gegenüber aktiviertem Wasserstoff zuerst die Wasserstoffatome. Gegenüber Sauerstoff (Luftsauerstoff) reagieren jedoch vordringlich die Alkylgruppen und zwar unter Bildung von Äthoxygruppen.

In Tab. 1 sind diese Ergebnisse am Beispiel der Umsetzung verschieden großer Mengen Benzoesäure mit Natriumdiäthylalanat zusammengestellt.

Die Menge Reagens ist also stets so zu wählen, daß nur die beiden Wasserstoffatome zur Reaktion kommen, d. h. stets ein Überschuß an Komplex vorhanden ist. Die in jedem Falle auftretende geringe Menge Äthan — nach den Analysenwerten etwa 3% — entsteht durch Reaktion mit dem von der Darstellung her noch in dieser Menge vorhandenen Aluminiumdiäthylchlorid. Hier ist also die Alkylgruppe nicht in einem Komplex mit 4-bindigem Aluminium und deshalb — wie ich bereits erwähnte — sehr reaktionsfähig. Von den zahlreichen Substanzen, die wir in ihrem Verhalten gegenüber komplexen Alanaten getestet haben, sind in Tab. 2 einige charakteristische Verbindungen aufgeführt. Diese Zusammenstellung soll die Genauigkeit und vor allem auch die Anwendungsbreite der Methode demonstrieren.

Tabelle 1

mg Einwaage	mg Reagens	% H_2	% C_2H_6
25	130	97,2	2,8
50	130	97,2	2,8
100	130	96,8	3,2
1000	130	50,7	49,3

Generell kann gesagt werden, daß die gefundenen Werte sehr gut mit den für den reaktionsfähigen Wasserstoff berechneten Ergebnissen übereinstimmen. Die Genauigkeit der Methode beträgt unter normalen Bedingungen 2% d. h. bis zu einem Gehalt von 2% aktivem Wasserstoff $\pm$ 0,03% absolut, über etwa 5% aktivem Wasserstoff $\pm$ 0,1% absolut. Der Blindwert der Bestimmung ist unter Anwendung von Anisol als Lösungsmittel bei einer Temperatur von 20° C maximal 0,03 ml Gas, in Pyridin allerdings etwa 0,1 ml. Die Erfassungsgrenze der Methode kann demnach mit etwa 0,05% aktivem Wasserstoff angegeben werden. Ein Heißwert war nur in Ausnahmefällen nötig, denn die Mehrzahl der Substanzen reagiert bereits bei Raumtemperatur mit dem komplexen Alanat. Diese Tatsache bedeutet gegenüber der Zerewitinoff-Methode nicht nur einen großen zeitlichen Gewinn, sondern stellt auch einen Sicherheitsfaktor dar, daß nämlich durch die normale, also nicht erhöhte Temperatur keine Nebenreaktionen, die zu einer Gasentwicklung führen könnten, eintreten. Die Reaktionsgeschwindigkeit in Anisol oder auch Anisol-Pyridingemisch ist unterschiedlich und von verschiedenen Faktoren, insbesondere den Konzentrationsverhältnissen abhängig. Wie bereits erwähnt, ist es in jedem Falle zweckmäßig, einen Überschuß an Komplex anzuwenden.

Tabelle 2

Substanz	% H ber.	% H gef.	akt. H ber.	Temp. °C	Lösungsmittel*	funkt. Gruppen
Anilin	2,15	2,16 2,17	2	20 95	A	NH_2
Monomethylanilin	0,94	0,91 0,92	1	20 95	A	NH
Monoäthylanilin	0,83	0,82 0,84	1	20 95	A	NH
Carbazol	0,62	0,60 0,61	1	20 95	A	NH
Oleylamin	0,40 0,80	0,42 0,80	1 2	20 95	A	NH_2
Harnstoff	6,60	6,6 6,7	4	20 95	A	$NH_2(2)$
Acetanilid	0,74	0,73 0,73	1	20 95	A	NH
p-Aminobenzoesäure	2,19	(1,90) 2,19	3	20 95	A	NH_2(COOH)
α-Alanin	3,36	(2,50) 3,36	3	20 95	A	NH_2(COOH)
Salicylsäure	1,45	1,47 1,47	2	20 95	A	OH(COOH)
Sulfosalicylsäure	1,38	1,36 1,36	3	20 95	P	OH/COOH/SO_3H
Acetylaceton	1,00	0,98 0,98	1	20 95	A	(OH)
Acetessigester	0,77	0,10 0,12	1	20 95	A	(OH)
Malonester	1,25	0,15 0,15	2	20 95	A	(OH)
Nitrobenzol	1,62	1,66 1,67	2	20 95	A	NO_2
Pikrinsäure	3,06	3,05 3,10	7	20 95	P	(3)NO_2/OH
o-Nitrophenol	2,16	2,14 2,18	3	20 95	A	NO_2/OH
Benzoesäure	0,82	0,83 0,83	1	20 95	A	COOH
Propionsäure	1,35	1,35 1,36	1	20 95	A	COOH

* A = Anisol; P = Pyridin.

Tabelle 2 (Fortsetzung)

Substanz	% H ber.	% H gef.	akt. H ber.	Temp. °C	Lösungsmittel*	funkt. Gruppen
Palmitinsäure	0,39	0,39 0,39	1	20 95	A	COOH
Maleinsäure	1,72	1,71 1,72	2	20 95	P	COOH (2)
Zimtsäure	0,68	0,68 0,71	1	20 95	A	COOH
α-Naphthol	0,70	0,70 0,70	1	20 95	A	OH
Phenol	1,06	1,07 1,09	1	20 95	A	OH
sec. Butanol	1,35	(1,17) 1,36	1	20 95	A	OH
sec. Octylalkohol	0,77	0,79 0,80	1	20 95	A	OH
Allylalkohol	1,72	(1,56) 1,74	1	20 95	P	OH
tert. Butylalkohol	1,35	1,32 1,32	1	20 95	P	OH
Dodecylmercaptan	0,49	0,50 0,50	1	20 95	A	SH
Thioacetamid	2,66	(2,2) 2,65	2	20 95	A	$CS\text{-}NH_2$

* A = Anisol; P = Pyridin.

Bei der Analyse keto-enol-tautomerer Substanzen haben wir Pyridin als Lösungsmittel vermieden, da dieses ja bekanntlich die Enolform katalysiert. Beim Acetylaceton haben wir in Anisol 1 aktiven Wasserstoff gefunden, beim Acetessigester und Malonester dagegen nur einen Bruchteil davon.

Der aktive Wasserstoff der Carboxyl-, Hydroxyl-, Sulfhydryl- und Sulfongruppe wird in jedem Falle glatt erhalten.

In Aminen, Aminosäuren und Säureamiden reagiert die NH_2-Gruppe mit beiden Wasserstoffatomen, mit Ausnahme höherer aliphatischer Amine, z. B. dem Oleylamin, das analog der Zerewitinoff-Reaktion in der Kälte nur mit einem, in der Wärme jedoch mit beiden Wasserstoffatomen reagiert. In der p-Aminobenzoesäure, α-Alanin sowie Thioacetamid ist der Kaltwert etwas zu niedrig. Es reagieren aber mehr als 1 Wasserstoffatom der NH_2-Gruppe.

Ein analoges Bild zeigt sich bei sekundärem Butanol und Allylalkohol. Bei theoretischem Heißwert sind die bei Raumtemperatur gefundenen Werte der Hydroxylgruppe zu niedrig.

Harnstoff reagiert bereits in der Kälte mit allen 4 H-Atomen. Die Nitrogruppe liefert sehr exakt und in jedem Falle 2 aktive Wasserstoffatome und zwar sowohl in der Kälte als auch in der Wärme. So sind wir nun in der Lage, wie die Beispiele Nitrobenzol, Pikrinsäure und o-Nitrophenol beweisen, auch in Gegenwart von Nitrogruppen eine genaue Bestimmung des aktiven Wasserstoffs auszuführen.

Das gleiche gilt für tertiäre Alkohole, die im Gegensatz zur Zerewitinoff-Bestimmung keine zu hohen Werte liefern. Eine teilweise Wasserabspaltung findet demnach bei der Alanatmethode nicht statt.

Berechnung. Unter Berücksichtigung des errechneten Mol-Volumens aus 97% Wasserstoff und 3% Äthan, ergibt sich der Prozentgehalt des aktiven Wasserstoffs zu:

$$\% H = \frac{1{,}008 \cdot 100 \cdot V_0}{E \cdot 22{,}42} = 4{,}496 \cdot \frac{V_0}{E}.$$

V_0 = reduziertes Volumen in Milliliter.
E = Einwaage in Milligramm.

Zusammenfassung

Es wird über eine modifizierte Methode zur mikroanalytischen Bestimmung des aktiven Wasserstoffs in organischen Substanzen berichtet. Die von Lieb und Schöniger als Ersatz der Grignard-Reaktion in die Mikroanalyse eingeführte Umsetzung mit dem wesentlich stärker und auch rascher reagierenden Lithiumaluminiumhydrid, konnte sich trotz vieler Vorteile nicht allgemein durchsetzen. Dies lag in erster Linie daran, daß das reine Lithiumalanat nur in sehr wenigen Lösungsmitteln, die zudem wegen ihres hohen Dampfdruckes für eine exakte Mikrobestimmung ungeeignet sind, löslich ist. Ersetzt man jedoch ein oder mehrere Wasserstoffatome des Alanats durch eine Alkyl- bzw. Alkoxygruppe, so führt dies zu einer wesentlichen Löslichkeitserhöhung. Unter den möglichen substituierten Alanaten, die wir auf ihre Brauchbarkeit zur Bestimmung aktiver Wasserstoffatome getestet haben, entsprach insbesondere das Natriumaluminiumdiäthyldihydrid weitgehend unseren Anforderungen. Es ist in Kohlenwasserstoffen, wie auch in stark polaren Lösungsmitteln sehr gut löslich. Dadurch ist auch die Möglichkeit für vergleichende Analysen mit Methylmagnesiumjodid gegeben, wodurch in manchen Fällen auf eine bestimmte Stellung oder auch sterische Hinderung der funktionellen Gruppe in der Molekel geschlossen werden kann. Die Anwendungsbreite wie auch die Genauigkeit der Alanatmethode wird an Hand der Analysendaten zahlreicher Testsubstanzen demonstriert.

Literatur

[1] Canhart, H. W., R. H. Blizzard, J. E. Johnson u. J. A. Krynitsky: NRL Report C 3419 (1949). — [2] Chaikin, S. W., u. W. G. Brown: J. Amer. chem.

Soc. **71**, 122 (1949). — NYSTROM, R. F., S. W. CHAIKIN und W. G. BROWN: J. Amer. chem. Soc. **71**, 3245 (1949). — [3] EVANS, R. N., J. E. DAVENPORT u. A. J. REVUKAS: Ind. Engng. Chem., anal. Edit. **12**, 301 (1940). — [4] FINHOLT, A. E., A. C. BOND u. H. J. SCHLESINGER: J. Amer. chem. Soc. **69**, 1199 (1947). — [5] HESSE, G., u. R. SCHRÖDEL: Liebigs Ann. Chem. **607**, 24 (1957). — [6] HOCHSTEIN, F. A., u. W. G. BROWN: J. Amer. chem. Soc. **70**, 3484 (1948). — [7] HOUBEN-WEYL: Methoden der organischen Chemie. Bd. II, analytische Methoden. — [8] KRYNITSKY, J. A., J. E. JOHNSON u. H. W. CARHART: J. Amer. chem. Soc. **70**, 486 (1948). — [9] LEHMAN, R. A., u. H. BASCH: Ind. Engng. Chem., anal. Edit. **17**, 428 (1945). — [10] LIEB, H., u. W. SCHÖNIGER: Mikrochemie **35**, 400 (1950); vgl. diese Z. **132**, 188 (1951). — [11] NYSTROM, R. F., u. W. G. BROWN: J. Amer. chem. Soc. **69**, 1197, 2548 (1947); **70**, 3738 (1948). — [12] NYSTROM, R. F., W. H. YANKO u. W. G. BROWN: J. Amer. chem. Soc. **70**, 441 (1948). — [13] PREGL-ROTH: Quantitative organische Mikroanalyse, 7. Aufl. Wien 1958. — [14] RAO, D. S., G. D. SHA u. V. S. PANSARE: Mikrochim. Acta (Wien) **1954**, 81; vgl. diese Z. **143**, 64 (1954). — [15] ROTH, H.: Mikrochemie **11**, 140 (1932); vgl. diese Z. **96**, 362 (1934); vgl. auch PREGL-ROTH: Quant. organ. Mikroanalyse, 7. Auflage, Wien 1958. — [16] SCHMITZ-DUMONT, O., u. V. HABERNICKEL: Naturwissenschaften **39**, 20 (1952); Chem. Ber. **90**, 1054 (1957); vgl. SCHMITZ-DUMONT, O., u. G. BUNGARD: Angew. Chem. **67**, 208 (1955). — [17] SCHÖNIGER, W.: diese Z. **133**, 4 (1951). — [17a] SCHÜTZE, M.: Angew. Chem. **70**, 697 (1958). — [18] SOLTYS, A.: Mikrochemie **20**, 107 (1936); vgl. diese Z. **112**, 47 (1938). — [19] TERENT'EV, A. P., K. D. ČERBAKOVA u. N. KREMENSKAJA: Ž. obšč. Chim. **17**, 919 (1947). — [20] TSCHUGAEFF, L.: Ber. dtsch. chem. Ges. **35**, 3912 (1902). — [21] ZAUGG, H. E., u. B. W. HORROM: Analyt. Chemistry **20**, 1026 (1948). — [22] ZEREWITINOFF, TH.: Ber. dtsch. chem. Ges. **40**, 2023 (1907); **41**, 2233 (1908); **42**, 4802 (1909); **43**, 3590 (1910); **47**, 1659, 2417 (1914); vgl. diese Z. **48**, 59 (1909); **51**, 511 (1912). — [23] ZIEGLER, K., H. G. GELLERT u. K. NAGEL: D.B.P. Nr. 918928 vom 7.10.54; vgl. auch ZIEGLER, K.: Englisches Patent Nr. 803178 vom 22.10.58; ZIEGLER, K., H. G. GELLERT, H. MARTIN, K. NAGEL u. J. SCHNEIDER: Liebigs Ann. Chem. **589**, 93 (1954).

Dr. WOLFGANG MERZ, Ludwigshafen am Rhein, Schwalbenweg 31

Die potentiometrische Titration von primären, sekundären und tertiären aliphatischen und aromatischen Aminen nebeneinander

Von

WALTER HUBER[1]

(Referat)

Aliphatische und aromatische Amine lassen sich acidimetrisch in nichtsauren, stark polaren Lösungsmitteln, wie Acetonitril, Nitrobenzol oder Nitromethan mit Perchlorsäure in Dioxan titrieren. Sollen die sechs möglichen Amin-Funktionen (primär, sekundär und tertiär, sowohl

[1] Angew. Chem. **72**, 865 (1960).

aliphatisch wie aromatisch) nebeneinander erfaßt werden, führt man mehrere potentiometrische Titrationen nach verschieden selektivierenden Vorbehandlungen durch. Ein Zusatz von Essigsäureanhydrid vor der Titration bewirkt, daß die primären und sekundären Amine acetyliert und die tertiären alphatischen und aromatischen Amine nebeneinander titriert werden. Anderseits bewirkt ein Zusatz von Salicylaldehyd, daß die primären Amine als Schiffsche Basen gebunden werden und sich nun sekundäre und tertiäre aliphatische Amine, ferner sekundäre und tertiäre aromatische Amine allerdings gemeinsam mit den Schiffschen Basen der primären aliphatischen Amine und schließlich die Schiffschen Basen der primären aromatischen Amine nebeneinander titrieren lassen. Ohne Vorbehandlung kann die Summe der aliphatischen, sowie die der aromatischen Amine bestimmt werden.

Als Lösungsmittel für die praktische Durchführung wurde eine Mischung von Eisessig, Dioxan und Nitromethan im Verhältnis 5:75:20 angewandt. Titrationsmittel war Perchlorsäure in Dioxan. Das Elektrodensystem bestand aus einer Glas- und einer Kalomelelektrode. Die potentiometrische Titrationskurven wurden mit einem Kompensationsschreiber registriert.

Tertiäre Amine lassen sich mit dem geschilderten Verfahren am besten bestimmen, da sie nach Zusatz von Essigsäureanhydrid direkt erfaßt werden können. Primäre aromatische Amine werden als Schiffsche Basen nach der Umsetzung mit Salicylaldehyd wohl direkt erfaßt, ihr Potentialsprung ist jedoch recht flach. Die übrigen Amine sind wohl gut erfaßbar, die erreichbaren Genauigkeiten sind jedoch infolge der indirekten Bestimmung stark von ihren Mengenverhältnissen abhängig.

Beim Vorliegen von Diaminen kann die Methode versagen, auch können Wasser und Ammoniak stören. Es wird meist zweckmäßig sein, durch Testmischungen gleicher qualitativer Zusammensetzung wie die Untersuchungsprobe die Lage der Art und Potentialsprünge zu untersuchen. Die Methode eignet sich dann auch bei Proben komplizierterer Zusammensetzung für Routineanalysen.

Dr. Walter Huber, Badische Anilin- & Sodafabrik, Ludwigshafen/Rhein

III. Bestimmungsmethoden zur Analyse organischer Verbindungen

1. Chemische Methoden

Laboratorio da Produção Mineral, Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro und Forschungslaboratorium Lobachemie, Wien XIX

Nachweis und Unterscheidung von isomeren organischen Verbindungen mit Hilfe von Tüpfelreaktionen

Von

F. Feigl und V. Anger

(Eingegangen am 24. Oktober 1960)

In der qualitativen organischen Analyse hat die Forschung nach neuen chemischen Methoden zum Nachweis und Unterscheidung von Isomeren bisher wenig Beachtung gefunden. Dies hängt vor allem damit zusammen, daß Isomere, die sich durch physikalische Konstanten unterscheiden, durch deren Bestimmung mittels physikalischer Methoden mit Sicherheit identifizierbar sind. Hierher gehörige Verfahren genügen mikrochemischen Anforderungen, sie verlangen indessen die Kenntnis der betreffenden, nicht immer ermittelten Konstanten, sowie in der Regel die vorherige Trennung der Isomeren oder aus diesen hergestellten Derivate. Dieses gilt auch für chromatographische Methoden, bei denen die chemische oder physikalische Identifizierung an adsorptiv getrennten isomeren Verbindungen einsetzt. Ein gewichtiger Grund für die Heranziehung physikalischer Methoden (darunter auch solcher, die kostspielige apparative Behelfe erfordern) ist, daß lange nur wenige eindeutige Nachweise bekannt waren, deren Anwendbarkeit zur Identifizierung von Isomeren hätte überprüft werden können. Diesbezüglich hat die organische Tüpfelanalyse durch die Auffindung vieler neuer mikrochemisch verwertbarer Umsetzungen organischer Verbindungen einen Wandel geschaffen. Hierfür haben Erfahrungen und Betrachtungsweise der Chemie der spezifischen, selektiven und empfindlichen Reaktionen wertvolle Richtlinien gegeben[6,7a]. Anregungen zu einer weitergehenden Berücksichtigung von unmittelbar anwendbaren chemischen Nachweisen von Isomeren sind daher von der Tüpfelanalyse und den zu deren Ausbau aufgewendeten Forschungsarbeiten ausgegangen. Hier hat die Überprüfung von Tüpfelreaktionen zum Nachweis sogenannter funktioneller Gruppen gezeigt, daß deren Umsetzungsfähigkeit weitgehend vom Molekülrest abhängt, da die

ermittelten Erfassungsgrenzen bei Verbindungen mit gleichen funktionellen Gruppen nur sehr selten äquivalenten Werten entsprechen. Die Unterschiede sind oft sehr erheblich, mitunter ist auch ein völliges Versagen von Gruppenreaktionen feststellbar. Es war somit zu erwarten, daß der Einfluß des Molekülrestes auf die Reaktionsfähigkeit von daran gebundenen Atomgruppen sich auch im chemischen Verhalten von isomeren organischen Verbindungen zeigen und allenfalls analytisch verwertbar sein müsse. Hierbei sind folgende Unterscheidungsmöglichkeiten zu beobachten:

1. Die Geschwindigkeiten und die Empfindlichkeiten von Umsetzungen, bei denen unmittelbar durch Farbe, Löslichkeitsverhalten usw. erkennbare Reaktionsprodukte entstehen, sind weitgehend verschieden.

2. Funktionelle Gruppen reagieren gleichartig, doch verhalten sich die Umsetzungsprodukte hinsichtlich ihrer unmittelbaren Erkennbarkeit oder bei zusätzlichen Nachweisreaktionen verschieden.

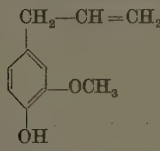
3. Die Gesamtkonfiguration des Moleküls gestattet nur bei bestimmten Isomeren den Eintritt von charakteristischen Umsetzungen.

Weitere Unterscheidungsmöglichkeiten ergeben sich, wenn eines der Isomeren durch Flüchtigkeit (Sublimierbarkeit) oder Löslichkeit eine Sonderstellung einnimmt und dadurch in einer gesonderten Phase nachgewiesen werden kann.

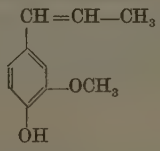
Bei Berücksichtigung der vorstehend angeführten Möglichkeiten, die sowohl für Umsetzungen auf nassem Wege als auch für Pyroreaktionen gelten, wurde festgestellt, daß wir derzeit über mehr als 40 Tüpfelreaktionen verfügen, durch die Isomere ohne vorhergehende Trennung, häufig bei ungünstigem Mischungsverhältnis, nachgewiesen werden können. Da mit Sicherheit die Auffindung weiterer für diese Aufgabe geeigneter Tüpfelreaktionen zu erwarten ist, so verweist dies auf ein neues Anwendungsgebiet der Tüpfelanalyse, das Interesse verdient.

Im nachfolgenden seien einige charakteristische Beispiele für die Identifizierung von Isomeren in der Tüpfelanalyse angeführt.

Unterscheidung von Eugenol und Isoeugenol



Eugenol



Isoeugenol

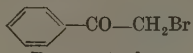
Eugenol. Diese Verbindung gibt als Allylderivat eine empfindliche, in ihrem Chemismus noch nicht aufgeklärte Farbreaktion (Rotfärbung) mit Phloroglucin[30].

Erfassungsgrenze[27]*:* 8 μg Eugenol.

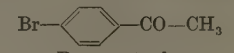
Isoeugenol[25]. Diese Verbindung spaltet als Propenylderivat bei Verschmelzen mit Benzoylperoxyd Acetaldehyd ab, das durch die Farbreaktion mit Nitroprussidnatrium und Morpholin (oder Piperidin) in der Gasphase nachgewiesen werden kann. Die Abspaltung erfolgt gemäß:

Erfassungsgrenze: 60 μg Isoeugenol.

Unterscheidung von ω-Bromacetophenon und p-Bromacetophenon[15]



ω-Bromacetophenon
F. P. 50° C



p-Bromacetophenon
F. P. 50° C

ω-Bromacetophenon reagiert als primäres Halogenalkyl mit Natriumthiosulfat unter Bildung eines sogenannten Bunteschen Salzes gemäß:

$$C_6H_5COCH_2Br + Na_2S_2O_3 \rightarrow Na[C_6H_5COCH_2S_2O_3] + NaBr$$

welches beim Erhitzen auf 180° C unter Abspaltung von Schwefeldioxyd zersetzt wird:

$$2\,Na[C_6H_5COCH_2S_2O_3] \rightarrow C_6H_5COCH_2SSCH_2COC_6H_5 + SO_2 + Na_2SO_4.$$

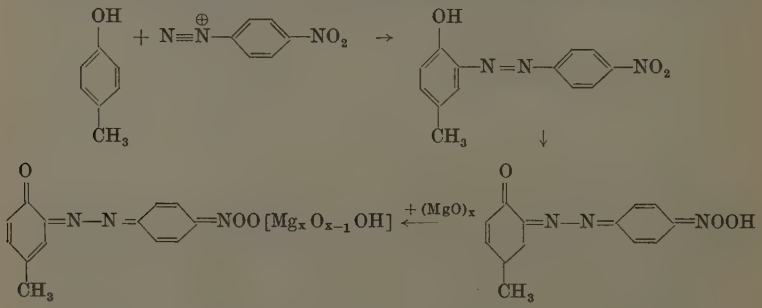
Schwefeldioxyd läßt sich leicht in der Gasphase mit Wasserstoffperoxyd befeuchtetem Kongopapier nachweisen.

p-Bromacetophenon zeigt diese Reaktion nicht.

Erfassungsgrenze: 10 μg ω-Bromacetophenon.

Nachweis von p-Kresol neben seinen Isomeren[9]

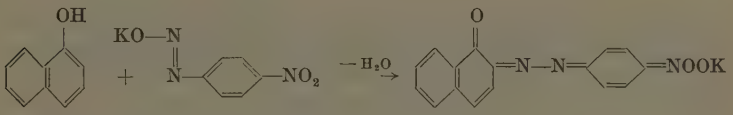
Lediglich p-Kresol kuppelt mit Diazoniumsalzen in alkalischer Lösung in Orthostellung. Kuppelt man mit p-Nitrophenyldiazoniumchlorid, entsteht ein Azofarbstoff, der dann in alkalischer Lösung mit Magnesiumoxyd einen blauen Lack bildet, wobei er in der Nitronsäureform reagiert



Erfassungsgrenze: 0,2 μg p-Kresol.

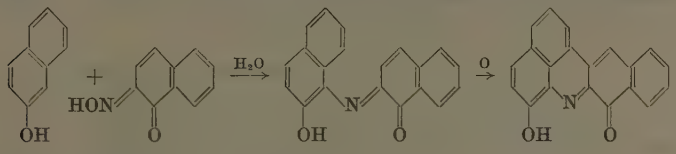
Naphthole[13]

α-Naphthol. Diese Verbindung bildet beim Erwärmen mit einer alkoholischen Lösung von Kalium-p-nitrophenylantidiazotat und verdünnter wäßriger Natriumcarbonatlösung ein blaues in Amylalkohol lösliches Alkalisalz der p-chinoiden Nitronsäureform des p-Nitrobenzolazo-α-naphthols:



Erfassungsgrenze: 1 μg α-Naphthol.

β-Naphthol. Dieses, nicht jedoch das α-Isomere, reagiert mit β-Nitroso-α-naphthol in alkoholischer Lösung bei Oxydation mit Salpetersäure unter Bildung einer intensiv rotvioletten Verbindung. Der Chemismus der Farbreaktion ist noch nicht sichergestellt. In Betracht kommt eine zu einem Ringschluß führende Kondensation und Oxydation gemäß:



Erfassungsgrenze: 0,1 μg β-Naphthol.

Unterscheidung von Phenylsalicylat und Hydrochinonmonobenzoat

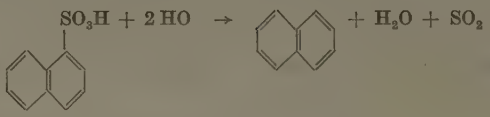
Sowohl Phenylsalicylat (I) als Hydrochinonmonobenzoat (II) werden durch Erhitzen mit Oxalsäuredihydrat auf pyrolytischem Wege verseift; hierbei wird jedoch lediglich bei Phenylsalicylat flüchtiges, in der Gasphase mit Gibbschem Reagens (2,6-Dichlorbenzochinon-4-chlorimin) leicht nachweisbares Phenol gebildet[20].

Erfassungsgrenze: 15 μg Phenylsalicylat.

Nachweis von α-Naphthalinsulfonsäure neben β-Naphthalinsulfonsäure[12a]

α-Naphthalinsulfonsäure wird in neutraler oder schwach saurer Lösung durch Natriumamalgam reduktiv unter Bildung von Naphthalin und

schwefliger Säure gespalten, während β-Naphthalinsulfonsäure unverändert bleibt:



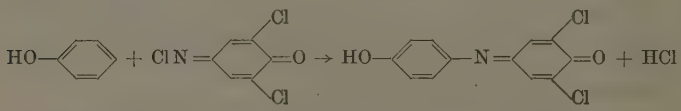
Das bei der Reaktion entstehende Schwefeldioxyd kann in der Gasphase durch die Blaufärbung von mit Wasserstoffperoxyd befeuchtetem Kongopapier nachgewiesen werden.

Erfassungsgrenze: 20 μg α-Naphthalinsulfonsäure.

Unterscheidung von Phenylschwefelsäure und Phenolsulfonsäure[11]

Im Gegensatz zu den Phenolsulfonsäuren $HO-C_6H_4-SO_3H$ läßt sich die Phenylschwefelsäure $C_6H_5-OSO_3H$ durch Erwärmen mit Mineralsäuren leicht zu freiem Phenol verseifen; das mit den Wasserdämpfen flüchtige Phenol kann in der Gasphase durch die Gibbssche Reaktion (Bildung eines blauen Indophenols mit 2,6-Dichlorbenzochinon-4-chlorimin) und Ammoniak, nachgewiesen werden:

$$C_6H_5-OSO_3H + H_2O \rightarrow C_6H_5OH + H_2SO_4$$

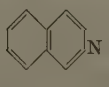


p-Phenolsulfonsäure bleibt unter diesen Bedingungen völlig unverändert. Sie wird jedoch durch Erhitzen mit Bernsteinsäure oder Phthalsäure auf 220—250° C unter Abspaltung von flüchtigem Phenol pyrolytisch verseift, wonach das Phenol wie oben nachgewiesen werden kann.

Erfassungsgrenze: 0,3 μg Phenylschwefelsäure, 0,5 μg Phenolsulfonsaures Natrium.

Unterscheidung von Chinolin und Isochinolin

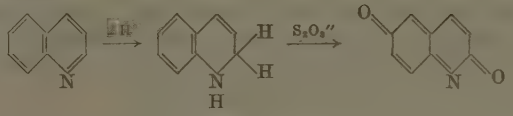
Chinolin K. P. 239° C



Isochinolin K. P. 240° C

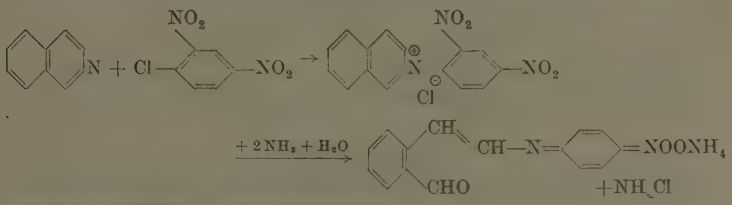
Sowohl Chinolin als auch Isochinolin lassen sich mit Zink und Mineralsäure zu Dihydroverbindungen reduzieren. Von diesen wird lediglich Dihydrochinolin mit Alkalipersulfat zu einer braunen chinoiden Ver-

bindung oxydiert[16]:



Erfassungsgrenze: 20 μg Chinolin.

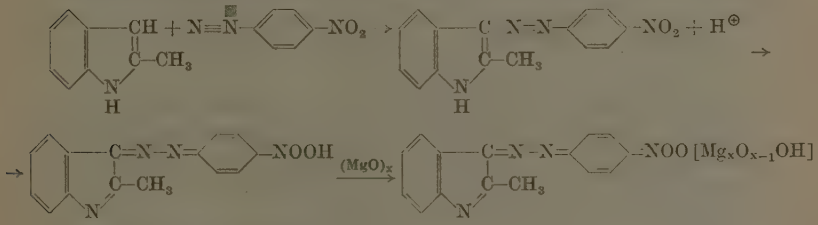
Chinolin und Isochinolin reagieren in gleicher Weise wie aliphatische und aromatische, primäre, sekundäre und tertiäre Amine mit 2,4-Dinitrochlorbenzol unter Bildung farbiger (zumeist orangefarbener) chinoider Verbindungen. Die Farbreaktion verläuft bei Isochinolin weit rascher und unter Bildung intensiver gefärbter Reaktionsprodukte[1]. Die nachstehenden Umsetzungen sind wahrscheinlich.



Erfassungsgrenze: 2 μg Isochinolin.

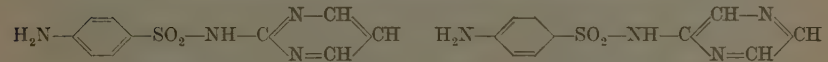
Nachweis von 2-Methylindol neben 3-Methylindol[13]

2-Methylindol kuppelt wie alle Indolderivate mit freier β-Stellung in alkalischer Lösung mit diazotiertem p-Nitranilin. Der entstehende Azofarbstoff bildet in seiner Acinitroform mit Magnesiumoxyd einen violetten Lack. 3-Methylindol (Skatol) reagiert unter diesen Bedingungen nicht:



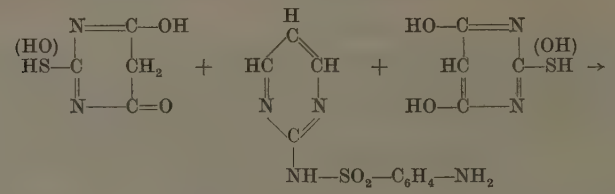
Erfassungsgrenze: 2 μg-2-Methylindol.

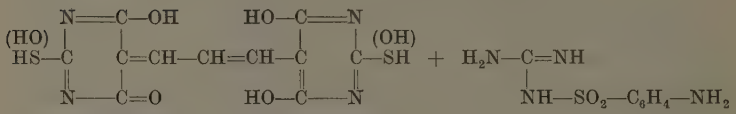
Unterscheidung von Sulfadiazin und Sulfapyrazin



Sulfadiazin (I) Sulfapyrazin (II)

Die beiden Sulfoamide I und II unterscheiden sich lediglich durch die Stellung der N-Atome im heterocyclischen Ring. Nur das Sulfadiazin bildet bei Erwärmen in wäßriger Lösung mit Barbitursäure oder Thiobarbitursäure farbige (orange bzw. rote), intensiv (grün bzw. goldgelb) fluorescierende Kondensationsprodukte gemäß[14]:

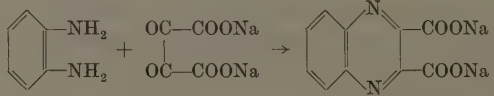




Erfassungsgrenze: 0,1 μg Sulfadiazin.

Phenylendiamine

o-Phenylendiamin. Diese Verbindung kondensiert in wäßriger Lösung bei gelinder Erwärmung mit dem Natriumsalz der Dioxyweinsäure zum Natriumsalz der Chinoxalin-2,3-dicarbonsäure:



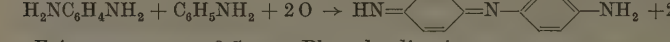
Chinoxalin-2,3-dicarbonsäure bildet in schwach essigsaurer Lösung ein intensiv rotviolettes innerkomplexes Ferrosalz[12b]. Führt man die Kondensation des o-Phenyldiamins mit Natriumdioxytartrat bei Anwesenheit von Ferroionen aus, dann bildet sich sogleich das farbige Ferrosalz.

Erfassungsgrenze: 5 μg o-Phenylendiamin.

p-Phenylendiamin. Diese Verbindung kann von ihren Isomeren durch ihr Verhalten gegen p-Dimethylaminobenzaldehyd unterschieden werden, mit dem sie ein rotes Kondensationsprodukt[29c] liefert, während die Schiffschen Basen der Isomeren eine gelbe Farbe aufweisen.

Erfassungsgrenze: 0,2 μg p-Phenylendiamin.

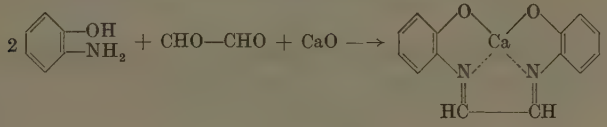
Ein anderer Nachweis von p-Phenylendiamin kann darauf begründet werden, daß es zusammen mit Anilin in schwach saurer Lösung mit Alkalipersulfat zu Phenylenblau, einem Indaminfarbstoff oxydiert wird[28]:



Erfassungsgrenze: 0,5 μg p-Phenylendiamin.

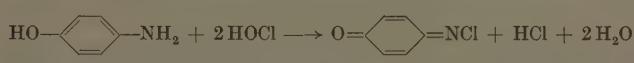
Aminophenole

o-Aminophenol. Zum spezifischen Nachweis auch bei Anwesenheit seiner Isomere kann die Bildung der an sich farblosen Schiffschen Base mit Glyoxal bei Gegenwart von CaO verwendet werden. Es bildet sich hierbei ein intensiv rotes innerkomplexes Calciumsalz[18]:

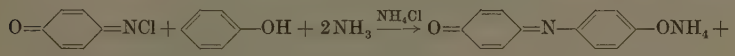


Erfassungsgrenze: 25 μg o-Aminophenol.

p-Aminophenol[19b]. Dieses Isomere wird durch freies Chlor oder unterchlorige Säure in p-Benzochinonmonochlorimin übergeführt:



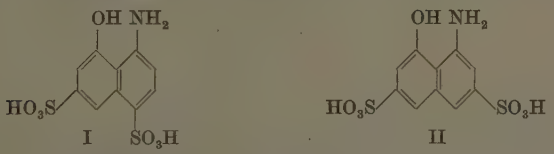
Das Chloramin kondensiert mit Phenol und Ammoniak zum blauen Ammoniumsalz des Indophenols:



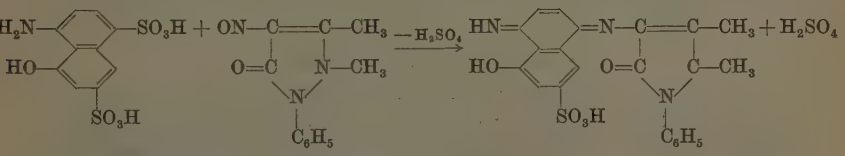
Erfassungsgrenze: 1 μg p-Aminophenol.

Unterscheidung der K-Säure von der H-Säure

Wie nachstehende Formeln zeigen, unterscheidet sich die K-Säure (8-Amino-1-naphthol-3,5-disulfosäure) (I) von der isomeren H-Säure (II) lediglich durch die Stellung einer Sulfogruppe.



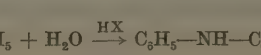
Charakteristisch für die K-Säure ist ihr Verhalten zu Nitrosoantipyrin, mit welchem es unter Bildung eines blauen, indiaminartigen Farbstoffes reagiert[3]:



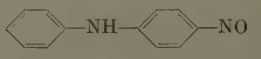
Erfassungsgrenze: 2 μg K-Säure.

Nitrosodiphenylamine

N-Nitrosodiphenylamin spaltet wie alle N-Nitrosoverbindungen[23] schon bei gelinder Erwärmung mit Mineralsäuren salpetrige Säure ab:



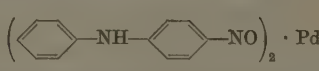
die in der Gasphase mit Griesschem Reagens empfindlich nachgewiesen werden kann. Demgemäß ist p-Nitrosodiphenylamin



als C-Nitrosoverbindung durch verdünnte Säuren nicht zersetzbar.

Erfassungsgrenze: 1 μg N-Nitrosodiphenylamin.

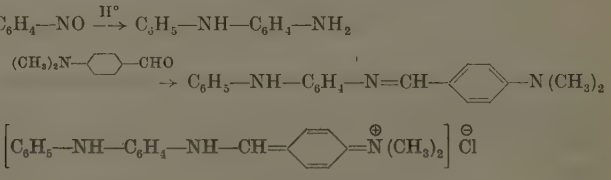
p-Nitrosodiphenylamin. Diese Verbindung reagiert als Derivat des p-Nitrosoanilins mit Palladiumchlorid unter Bildung einer unlöslichen roten Molekülverbindung[22]:



Weder N-Nitrosodiphenylamin noch andere C-Nitrosodiphenylamine reagieren mit Palladiumchlorid.

Erfassungsgrenze: 0,05 μg p-Nitrosodiphenylamin.

Ein anderer Nachweis auf C-Nitrosodiphenylamine beruht darauf, daß deren NO-Gruppe durch Ascorbinsäure zur Aminogruppe reduziert wird; mit p-Dimethylaminobenzaldehyd erfolgt Kondensation zu einer Schiffschen Base, die mit Säuren intensiv gefärbte chinoide Salze bildet[17]:



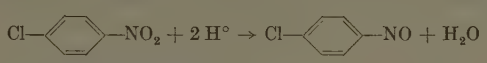
Erfassungsgrenze: 0,3 μg p-Nitrosodiphenylamin.

Nachweis von p-Chlornitrobenzol

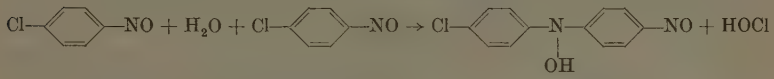
p-Chlornitrobenzol läßt sich in Anwesenheit seiner Isomeren durch sein besonderes Verhalten gegenüber Diphenylbenzidin und Devardalegierung nachweisen. Wird p-Chlornitrobenzol mit einer Lösung von Diphenylbenzidin in 80%iger Schwefelsäure und einer Spur Devarda-

legierung gelinde im Wasserbad erwärmt, so bildet sich Diphenylbenzidinblau. Die Farbreaktion beruht auf dem Ablauf folgender Teilreaktionen[2]:

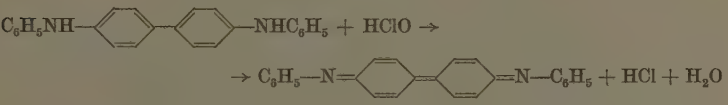
1. Reduktion des p-Chlornitrobenzols zu p-Chlornitrosobenzol:



2. Kondensation zweier Moleküle p-Chlornitrosobenzol:



3. Oxydation des Diphenylbenzidins durch unterchlorige Säure zum chinoiden Diphenylbenzidinblau:



Erfassungsgrenze: 5 μg p-Chlornitrobenzol.

Nitrophenole[19]

o-Nitrophenol. Im Gegensatz zu seinen Isomeren ist o-Nitrophenol leicht flüchtig. Es kann demnach dadurch nachgewiesen werden, daß man die bei 120°C abgegebenen Dämpfe auf ein mit Alkalihydroxyd befeuchtetes Filtrierpapier einwirken läßt, wobei ein gelber Fleck von Alkali-o-nitrophenolat entsteht.

Erfassungsgrenze: 1,5 μg o-Nitrophenol.

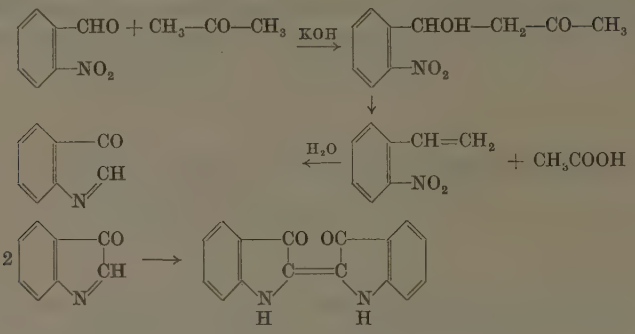
p-Nitrophenol. Dieses Isomere gibt mit hydratischem Natriumthiosulfat bei 120°C eine gelbe Schmelze unter Bildung des Natriumphenolates. Wird die Schmelze in Wasser gelöst und mit Benzol extrahiert, so bleibt bei Anwesenheit von p-Nitrophenol die wäßrige Schicht gelb. Da die beiden anderen schwächer sauren Isomeren kein gleichartiges Verhalten zeigen, so kann darauf ein selektiver Nachweis von p-Nitrophenol begründet werden, der auch in Gemischen der Isomeren zum Ziele führt.

Erfassungsgrenze: 2,5 μg p-Nitrophenol.

Nitrobenzaldehyde

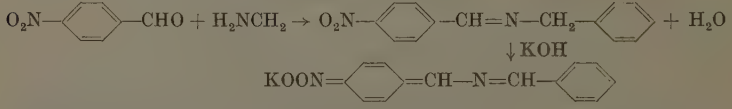
o-Nitrobenzaldehyd. Diese Verbindung läßt sich selektiv in Gegenwart der anderen isomeren Nitrobenzaldehyde durch ihre Umsetzung mit Aceton in alkalischer Lösung, die zu Indigo führt, nachweisen. Die

Umsetzung erfolgt gemäß:



Erfassungsgrenze: 50 μg o-Nitrobenzaldehyd.

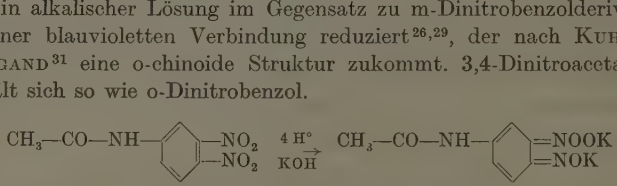
p-Nitrobenzaldehyd[10]. Diese Verbindung gibt wie alle Aldehyde eine Schiffsche Base mit Benzylamin. Es lagert sich jedoch nur die Schiffbase des p-Nitrobenzaldehyds mit KOH zu einem roten Alkalisalz einer p-chinoiden Nitronsäure um:



Erfassungsgrenze: 1 μg p-Nitrobenzaldehyd.

Nitraniline

m-Nitranilin. Die Acetylverbindung des m-Nitranilins liefert bei Nitrierung fast ausschließlich Dinitroacetanilide mit o-ständigen Nitrogruppen (2,3-Dinitroacetanilid und 3,4-Dinitroacetanilid)[33]. Wird die Nitrierung mit Essigsäureanhydrid-Salpetersäure durchgeführt, so entsteht fast ausschließlich das letztgenannte Isomere[32]. o-Dinitrobenzol wird in alkalischer Lösung im Gegensatz zu m-Dinitrobenzolderivaten zu einer blauvioletten Verbindung reduziert[26,29], der nach Kuhn u. Weygand[31] eine o-chinoide Struktur zukommt. 3,4-Dinitroacetanilid verhält sich so wie o-Dinitrobenzol.



Da unter gleichen Bedingungen o- und p-Nitroacetanilide nicht oder lediglich zu m-Dinitroderivaten nitriert werden, die von Phenylhydrazin nicht reduziert werden, so ist der obige Nachweis selektiv.

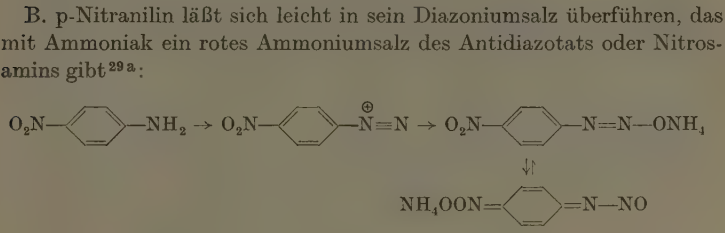
Erfassungsgrenze: 20 μg m-Nitranilin.

p-Nitranilin. Zum Nachweis dieser Verbindung neben ihren Isomeren können folgende Umsetzungen herangezogen werden:

A. p-Nitranilin wird durch Ascorbinsäure zu p-Phenylendiamin reduziert; bei Anwesenheit von p-Dimethylaminobenzaldehyd ensteht eine rote Schiffsche Base[26], während die aus dem Isomeren gebildeten Phenylendiamine gelbe Schiffbasen liefern.

Erfassungsgrenze: 0,5 μg p-Nitranilin.

B. p-Nitranilin läßt sich leicht in sein Diazoniumsalz überführen, das mit Ammoniak ein rotes Ammoniumsalz des Antidiazotats oder Nitrosamins gibt[29a]:



Erfassungsgrenze: 1 μg p-Nitranilin.

C. Das Diazoniumsalz des p-Nitranilin kuppelt in alkalischer Lösung mit α-Naphthol. Das Kuppelungsprodukt (p-Nitrobenzol-azo-α-naphthol) gibt mit Magnesiumoxyd einen tiefblauen Lack[13]. Diese Reaktion wird von den Isomeren nicht gegeben.

Erfassungsgrenze: 0,1 μg p-Nitranilin.

Weitere Beispiele für den Nachweis und die Unterscheidung von isomeren organischen Verbindungen betreffen: Dinitrobenzole[8], Pyridincarbonsäuren[7b], Nitrosophenole[5], Naphthylamine[24], Salicylaldehyd[21], Dioxybenzole[4a] und Trioxybenzole[4b].

Literatur

[1] Amaral, J. R.: in Feigl[7], S. 445. — [2] Anger, V.: Mikrochim. Acta **1960**, 827. — [3] Anger, V.: in Feigl[7], S. 562. — [4] Eegriwe, E.: [a] diese Z. **125**, 241 (1943); [b] diese Z. **126**, 134 (1943). — [5] Feigl, F.: Analyt. Chemistry **27**, 1315 (1955); vgl. diese Z. **151**, 294 (1956). — [6] Feigl, F.: Chemistry of Specific, Selective and Sensitive Reactions, New York 1949. — [7] Feigl, F.: Spot Tests in Organic Analysis, 6th edit., New York 1960. [a] Kapitel 1; [b] S. 297. — [8] Feigl, F., J. R. Amaral u. V. Gentil: Mikrochim. Acta (Wien) **1957**, 726; vgl. diese Z. **162**, 140 (1958). — [9] Feigl, F., u. V. Anger: Analyt. Chemistry 1960, im Druck. — [10] Feigl, F., u. V. Anger: Anal. Chim. Acta, 1961 im Druck. — [11] Feigl, F., u. V. Anger: Mikrochim. Acta (Wien) **1960**, 409. — [12] Feigl, F., u. V. Anger: in Feigl[7], [a] S. 402; [b] S. 605. — [13] Feigl, F., u. V. Anger: unveröffentlichte Versuche. — [14] Feigl, F., V. Anger u. V. Gentil: Clin. chim. Acta **5**, 153 (1960). — [15] Feigl, F., V. Anger u. D. Goldstein: Mikrochim. Acta (Wien) **1960**, 231. — [16] Feigl, F., u. V. Gentil: Analyt. Chemistry **26**, 1309 (1956); vgl. diese Z. **155**, 307 (1957). — [17] Feigl, F., u. D. Goldstein: Microchem. J. **1**, 136 (1957). — [18] Feigl, F., u. D. Goldstein: diese Z. **163**, 30 (1958). — Goldstein, D., u. C. Stark-Mayer: Anal. chim. Acta (Amsterdam) **19**, 437 (1958); vgl. diese Z. **169**,

123 (1959). — BAYER, E.: Chem. Ber. **90**, 2325 (1957). — [19] FEIGL, F., u. D. HAGUENAUER-CASTRO: Chemist-Analyst **49**, (1960), im Druck. — [20] FEIGL, F., u. E. JUNGREIS: Analyt. Chemistry **31**, 2099 (1959); vgl. diese Z. **176**, 463 (1960). — [21] FEIGL, F., u. W. A. MANNHEIMER: in FEIGL[7], S. 410. — [22] FEIGL, F., u. J. E. R. MARINS: in FEIGL[7], S. 170. — [23] FEIGL, F., u. C. COSTA NETO: Analyt. Chemistry **28**, 1311 (1956); vgl. diese Z. **155**, 303 (1957). — [24] FEIGL, F., C. COSTA NETO u. E. SILVA: Analyt. Chemistry **27**, 1319 (1955); vgl. diese Z. **153**, 230 (1956). — [25] FEIGL, F., u. E. SILVA: Analyst **82**, 582 (1957); vgl. diese Z. **161**, 448 (1958). — [26] FEIGL, F., u. C. STARK-MAYER: Chemist-Analyst **46**, 37 (1957); vgl. diese Z. **161**, 457 (1958). — [27] HASHIMOTO, Y.: in FEIGL[7], S. 321. — [28] HEIM, O.: Ind. Engng. Chem., anal. Edit. **7**, 146 (1935); vgl. diese Z. **109**, 59 (1937). — [29] JUNGREIS, E.: in FEIGL[7]; [a] S. 363; [b] S. 413; [c] 446. — [30] KOBERT, K.: diese Z. **46**, 711 (1907). — [31] KUHN, R., u. F. WEYGAND: Ber. dtsch. chem. Ges. **69**, 1969 (1936). — [32] PICET, A., u. E. KHOTINSKY: Ber. dtsch. chem. Ges. **40**, 1165 (1907). — [33] WENDER, U.: Gazz. chim. ital. **19**, 225 (1889).

Prof. Dr. F. FEIGL, Rio de Janeiro, Avenida Pasteur 404 (Brasilien)

A. G. f. Zinkindustrie vorm. W. Grillo, Duisburg-Hamborn

Wasserbestimmung in organischen Substanzen mit chemischen Methoden

Von

ERNST EBERIUS

(Eingegangen am 15. Oktober 1960)

Die Wasserbestimmung im Bereich organischer Verbindungen dient einerseits der Ermittlung bereits vorhandenen, andererseits des durch chemische Umsetzung oder durch Verbrennung entstandenen Wassers, also der Verfolgung eines Reaktionsprozesses oder der Elementaranalyse.

Gegenüberstellung der physikalischen und chemischen Methoden

Die quantitative Bestimmung bereits vorhandenen Wassers, vorliegend als Konstitutions- oder Kristallwasser, oder eingebaut in ein Gel oder adsorptiv gebunden oder als grobe Feuchtigkeit, wird ermöglicht durch eine Vielfalt physikalischer und durch eine hierzu vergleichsweise kleine Gruppe chemischer Methoden. Die Gruppen unterscheiden sich durch das unterschiedliche Ansprechen auf das System Wasser + Trägersubstanz. Der für den Wassergehalt stehende physikalische Effekt, z. B. der dielektrische Befund, die Leitfähigkeit, die Brechung, der Gewichtsverlust beim Trocknen, ist nie allein durch das Wasser festgelegt, sondern stets durch Art und Menge der Trägersubstanz mitbedingt. In Zweistoffsystemen mit Wasser als niedrigprozentiger Komponente ist die gegenseitige Beeinflussung noch relativ einfach zu übersehen, zu kompensieren

oder auszuschalten, aber in Drei- und Mehrstoffsystemen kann sie die Bestimmung verfälschen oder unmöglich machen.

Die physikalischen Methoden sind unspezifisch. Sie bedürfen entweder der Eichung unter strenger Beachtung der bei der beabsichtigten Anwendung vorliegenden Gegebenheit, z. B. der Zusammensetzung des Systems, der Bindungsfestigkeit, der Temperatur, des Druckes usw., oder man arbeitet nach Absprache, indem man beim Trocknen den Gewichtsverlust einer eingewogenen Menge nach einer bestimmten Zeit und bei einer bestimmten Temperatur dem Wassergehalt gleichsetzt. Dadurch wird wohl eine hinreichende Reproduzierbarkeit gewährleistet, was sehr oft genügt, aber die Kenntnis des wahren Wassergehaltes nicht unbedingt angestrebt.

Demgegenüber sind die chemischen Methoden spezifisch, weil bei diesen allein das Wasser mit dem zugesetzten Reagens entweder stöchiometrisch oder dem Gehalt streng proportional und frei von Nebenreaktionen mit den Begleitstoffen in reproduzierbarer Weise reagiert.

Natürlich gibt es auch Übergänge zwischen physikalischen und chemischen Methoden. Hierzu gehören das Trocknen in Gegenwart eines Trockenmittels, das aus den thermisch ausgetriebenen Substanzen das Wasser selektiv herausfängt, oder die Umsetzung des Wassers in einem strömenden Gas mit Calciumhydrid unter laufender Messung der Reaktionswärme. Aber in beiden Fällen ist der physikalische Effekt maßgebend: beim Trocknen das Austreiben, bei der Hydridmethode die Wärmemessung, und nicht wie bei den eigentlichen chemischen Methoden die spezifische Umsetzung des Wassers unter meßbarem Verbrauch des Reaktionsmittels oder der meßbaren Entstehung eines Reaktionsproduktes.

Chemische Methoden

Grundschemata

Zwei Grundschemata kommen in Betracht:

I. *Einstufige Umsetzung:* Wasser + Reagens = Reaktionsprodukt, wobei a) Verbrauch des Reagenses
b) entstandenes Reaktionsprodukt
dem Wassergehalt entspricht.

Alleiniger Repräsentant der Gruppe Ia ist die nahezu universell anwendbare Titration des Wassers mit Karl-Fischer-Lösung, während die Entstehung von Acetylen aus Wasser und Calciumcarbid der Gruppe Ib entspricht.

II. *Mehrstufige Umsetzung.* Vorgang 1: Wasser + Reagens A = Reaktionsprodukt B; Vorgang 2: Reaktionsprodukt B + Reagens C = Reaktionsprodukt D.

A ist meist ein Säurechlorid, seltener ein Säureanhydrid oder ein Nitrid oder ein Amid, *B* eine Säure oder Base, so daß Vorgang 2 als acidimetrische Titration ablaufen kann

a) in Gegenwart von *A* (Umsetzung des Wassers mit den Anhydriden der Essig- oder Benzoesäure),

b) nach Vernichtung von *A* (Umsetzung des Wassers mit Acetylchlorid),

c) nach Abtrennen von *B* (Umsetzung des Wassers mit anorganischen Chloriden oder höheren organischen Säurechloriden, Titration des abgespaltenen und außerhalb des Reaktionssystems aufgefangenen *B* = Chlorwasserstoff oder Ammoniak aus Nitriden oder Amiden).

Die Gruppen Ia, Ib und IIb dienen vorzugsweise der Bestimmung des in irgendeiner Form bereits vorliegenden Wassers, die Gruppen IIa und IIc der Bestimmung des durch Verbrennung entstandenen Wassers. Der Gruppe Ia bedient man sich auch zur Ermittlung des Wassers bei der Untersuchung funktioneller Gruppen und bei der Verfolgung von Umsetzungen unter Wasserbildung, z. B. von Veresterungen.

Methodische Voraussetzungen

Ablauf und Brauchbarkeit der chemischen Verfahren sind an bestimmte allgemeine und an fallweise Voraussetzungen geknüpft.

Allgemein ist zu beachten, daß Reaktionsmittel und Reaktionsgefäße vor Fremdfeuchtigkeit jeder Art zu bewahren sind, was bei der Bestimmung von nur einigen Milligramm Wasser nicht ganz einfach ist, wobei Schläuche, Pipetten und größere Glasflächen in Kolben und Rohren besonders tückische Wasservehikel sind. Bei der Wasserbestimmung in unlöslichen Substanzen (vegetabilische und tierische Produkte, Textilien, Plaste) ist auf die Eignung des Extraktionsmittels, seine Verträglichkeit mit der Substanz wie mit dem Reagens, sowie auf Dauer, Temperatur und Vollständigkeit der Extraktion zu achten. Der Titerstellung durch Einbringen bekannter Wassermengen ist besondere Aufmerksamkeit zu schenken, da durch den nicht berücksichtigten, aber stets vorhandenen Wassergehalt von Lösungs- und Verdünnungsmitteln ein Mehrfaches der beabsichtigt eingebrachten Wassermenge eingeschleppt werden kann. Bei der Titerstellung durch Eintropfen von Wasser ist die Abhängigkeit der Tropfengröße von der Oberflächenspannung, einmal gemessen in Luft, das andere Mal in der Atmosphäre über dem organischen Lösungsmittel, von Bedeutung, vor allem in der Fein- und Mikroanalyse. Fallweise ist auf hinreichende Reaktionsdauer und -temperatur zu achten, z.B. bei den mit Wasser träge reagierenden Anhydriden, ferner auf Umsetzungen des Reagenses mit dem Lösungs- oder Verdünnungsmittel, z.B. auf den die Wasserbestimmung verfälschenden Einfluß des Acetons auf Karl-Fischer-Lösung oder von niederen Alkoholen auf Acetylchlorid. Schließlich sei noch

auf die Gefahr des Verdampfens der Säurechloride und des Zurückhaltens des entstandenen Chlorwasserstoffs im Säurechlorid hingewiesen.

Diese in ihrer Vielfalt nur angedeuteten und die Spezifität der Umsetzung mit Wasser beeinträchtigenden Störungen haben bewirkt, daß von der großen Zahl der zunächst brauchbar scheinenden Methoden kaum ein Dutzend bei der Erprobung befriedigt haben, und daß von diesen nur drei Methoden von allgemeinem Interesse sind. Es sind dies die Titration mit Karl-Fischer-Lösung, die Umsetzung des Wassers mit Acetylchlorid in flüssigem Medium und die Umsetzung des Wassers in der Gasphase mit verflüssigten, höheren Säurechloriden.

Die Karl-Fischer-Lösung[7,11,18] *(KFL)*

Die KFL enthält elementares Jod und Schwefeldioxyd gelöst in einem Methanol/Pyridin-Gemisch. Das Seltsame an diesem Vierstoffsystem ist, daß die Dreistoffsysteme Jod/Schwefeldioxyd/Methanol und Jod/Schwefeldioxyd/Pyridin instabil sind, dagegen das aus diesen instabilen Dreistoffsystemen zusammengesetzte Vierstoffsystem wider Erwarten stabil ist. Es stellt gleichsam ein chemisches Kartenhaus dar, das bei der geringsten Darreichung von Wasser zusammenbricht. Die aus der Jodometrie bekannte, von Karl Fischer[11] und auch heute noch weithin als Umsatzgleichung angesehene Formulierung nach Bunsen für die Reaktion in wäßriger Lösung

$$2\,H_2O + SO_2 + J_2 \quad = \quad H_2SO_4 + 2\,HJ$$

ist unzutreffend; denn bei der Fischer-Titration entsprechen nicht zwei Mole Wasser, sondern nur ein Mol Wasser einem Mol Jod. Die Reaktionsgleichung lautet, zerlegt nach den Komponenten, in methanolfreier KFL

$$H_2O + SO_2 + J_2 + C_5H_5N = C_5H_4N \cdot SO_3H + 2\,HJ,$$

in pyridinfreier KFL

$$H_2O + SO_2 + J_2 + CH_3OH = CH_3SO_4H + 2\,HJ\,.$$

Bemerkenswert ist, daß die Umsetzungsgeschwindigkeit in der pyridinfreien, nur methanolhaltigen Lösung vom Verhältnis SO_2/CH_3OH abhängt, und die bis zu einem bestimmten unteren SO_2-Gehalt äußerst träge Reaktion durch Zugabe geringer Pyridinmengen beschleunigt wird. Das Methanol in der KFL stabilisiert einerseits die Beständigkeit des ungemein reaktionsfähigen Systems Jod/Schwefeldioxyd/Pyridin, vermindert aber andererseits durch seine Wasserähnlichkeit die Titerbeständigkeit der KFL[7], die durch Austausch des Methanols gegen Dimethylenglykol (Cellosolve)[8,20], erhöht werden kann. Man kann auch statt mit einer kompletten KFL mit zwei Teillösungen arbeiten, indem zunächst eine

Abmessung von Schwefeldioxyd/Pyridin vorgelegt und dann mit dem titerbeständigen Jod/Methanol titriert wird[14].

Es empfiehlt sich, mit der zweckmäßig auf einen Titer von 3—4 mg Wasser/ml KFL eingestellten Lösung nicht mehr als 150 mg Wasser zu titrieren, weil darüber hinaus der visuelle wie elektrometrische Umschlag unscharf wird.

Durch Mikrotitration mit einem Titer von 1—2 mg Wasser/ml KFL kann in einem möglichst klein zu haltenden Volumen noch etwa 0,5 mg Wasser auf $\pm 30\%$ bestimmt werden. Bei Mikro- wie bei allen Feintitrationen soll die zu titrierende Substanz mit einem Methanol/Pyridin-Gemisch aufgenommen bzw. verdünnt werden, das der Zusammensetzung der verwendeten KFL entspricht, weil dieses Verhältnis den Verbrauch an KFL, wenn auch geringfügig, beeinflußt[9]. Eine Blindtitration ist stets auszuführen.

Geeignete Lösungs- und Verdünnungsmittel sind Alkohole, Glycerin, Glykole, organische Säuren und Pyridin. Weniger brauchbar sind Ester, Äther, einfache und halogenierte Kohlenwasserstoffe. Aldehyde, Ketone und Mercaptane stören.

Mit KFL läßt sich das in organischen Flüssigkeiten ursprünglich enthaltene oder durch eine Reaktion entstandene Wasser ebenso schnell und sicher bestimmen wie das Wasser in Extraktionsmitteln nach der Behandlung fester Substanzen oder in flüssigen Absorptionsmitteln nach dem Durchgang feuchter Gase. Von besonderer Wichtigkeit ist die KFL-Titration für thermisch labile (Schieß- und Sprengstoffe)[4,5], luftempfindliche und wasserarme Substanzen (pflanzliche und Mineralöle, Brenn- und Treibstoffe) oder zur Bestimmung stark gebundenen Wassers (Pflanzenteile, Wurst, Leder, Melasse).

Das Acetylchlorid[22]

Mittels Acetylchlorid erfolgt die Wasserbestimmung dreistufig:

Vorgang 1 $H_2O + CH_3COCl = CH_3COOH + HCl$

Vorgang 2 $ROH + CH_3COCl = CH_3COOR + HCl$

Vorgang 3 Die entstandene Säure wird mit eingestellter Lauge titriert und aus dem Titrationsergebnis der Wassergehalt errechnet.

Außerdem muß in einer Parallelbestimmung die zur Hauptbestimmung verwendete Menge Acetylchlorid nur mit Alkohol umgesetzt werden. Die Differenz der hierbei verbrauchten Lauge gegen den Verbrauch bei der Hauptbestimmung entspricht dem Wassergehalt. In summa entsprechen also nicht gemäß Vorgang 1 zwei Äquivalente Säure einem Mol Wasser, sondern nur 1 Äquivalent Säure!

Da Alkohol mit dem Acetylchlorid reagiert, entfallen die Alkohole, in Sonderheit das Methanol, als Entwässerungs-, Lösungs- oder Adsorp-

tionsmittel, wodurch die Anwendung der Acetylchloridmethode im Vergleich zur Fischer-Titration erheblich eingeschränkt ist.

Wie bereits die Erfinder der Methode, Smith u. Bryant[22], gezeigt haben, ist sie besonders zur Wasserbestimmung in den Substanzen geeignet, die der KFL Schwierigkeiten machen, nämlich in Kohlenwasserstoffen, Estern, Äthern und Aceton bis hinunter zu 2 mg Wasser. Neuerdings wurde von Jordan u. Fischer[15] das Verfahren zur Wasserbestimmung in reinem Aceton durchgearbeitet. Von Kaufmann u. Funke[16] wurde es zu einer Präzisions- und Verbandsvorschrift zur Wasserbestimmung in Speiseölen, Butter, Margarine und Fetten entwickelt, wobei zur Vernichtung des überschüssigen Acetylchlorids Anilin statt Methanol verwendet wird.

Zur Analysenpraxis sei vermerkt, daß das Acetylchlorid (KP 50,9° C) in Toluol gelöst der meist mit Pyridin verdünnten oder angeteigten Substanz zugesetzt wird. Abgesehen von den niederen Alkoholen und Aminen stören Ameisensäure, Glycerin, Glykol und Aldehyde. Anstelle von Acetylchlorid wurden bisher ohne Erfolg Benzoyl-[13], Laurinsäure-[12] und Stearinsäurechlorid[21] vorgeschlagen.

Anorganische Chloride und verflüssigte, organische Säurechloride

Diese individuell und nach dem Aggregatzustand sehr verschiedenen Substanzen werden hier zu einer Gruppe zusammengefaßt, weil jede dieser Verbindungen mit Wasser unter Abspaltung von Chlorwasserstoff reagiert, der ausgetrieben, aufgefangen und titriert wird.

An anorganischen Chloriden wurden die in Tab. 1 angeführten probiert.

Tabelle 1

Nr.	Substanz	FP °C	KP °C
1	Aluminium(III)-chlorid	190 (2,5 atm.)	183
2	Antimon(III)-chlorid	73,2	219
3	Arsen(III)-chlorid	— 13	130
4	Titan(IV)-chlorid	— 23	136,5
5	Zirkonium(IV)-chlorid	437 (Druck)	

Von diesen Chloriden hat sich bisher nur das Aluminium(III)-chlorid bewährt[10], das bei 145° C in einem wasser- und sauerstofffreien Wasserstoffstrom verdampft und mit diesem bei 450° C dem wasserhaltigen Wasserstoffstrom zugeführt wird. Der nach

$$2\,AlCl_3 + 3\,H_2O = Al_2O_3 + 6\,HCl$$

entstehende Chlorwasserstoff wird laufend mit Lauge titriert, nachdem das Aluminiumoxyd und das unverbrauchte Chlorid in einem kalten Rohr vor dem Absorptions- und Titriergefäß niedergeschlagen worden sind.

Die anderen anorganischen Chloride reagieren zu langsam mit den geringen Mengen Wasserdampf. Wird zur Reaktionsbeschleunigung die Chloridtemperatur erhöht, so wächst durch die gesteigerte Verflüchtigung des Chlorids der Blindwert in nicht mehr tragbarem Ausmaß.

Aus der großen Zahl der geprüften organischen Säurechloride sind die in Tab. 2 aufgeführten übriggeblieben.

Tabelle 2

Nr.	Substanz	FP °C	KP °C	Arbeitstemperatur °C	H_2O:HCl
1	Naphthylphosphinsäuredichlorid	60		105—110	1:1
2	α-Naphthylphosphorigsäuredichlorid	flüssig bei Z.-T.		20	1:1
3	Zimtsäurechlorid	36	238	60—70	1:2
4	Succinylchlorid	17	192	etwa 60	1:2

Diese Chloride werden in kleinen Apparaturen, die den Eigenheiten der Substanz angepaßt sein müssen, verflüssigt (geschmolzen bzw. gelöst) und bei konstanter Temperatur gehalten. Durch die Flüssigkeit wird der wasserhaltige Gasstrom geleitet, z. B. der Sauerstoffstrom aus dem Verbrennungsrohr der Elementaranalyse. Zur Ermittlung des Blindwertes wird entweder ein inerter, scharf getrockneter Gasstrom mit einer bestimmten Strömungsgeschwindigkeit während einer festgelegten Zeit hindurchgeschickt und auf diese Weise die Menge an mitgerissenem Chlorid oder abgespaltenem Chlorwasserstoff gefunden, oder ein inerter Gasstrom wird durch Glühen von kristallwasserhaltigen Verbindungen ($BaCl_2 \cdot 2\,H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5\,H_2O$) mit einer bekannten Wassermenge beladen und aus dem abgespaltenen und titrierten Chlorwasserstoff wird die Mißweisung bestimmt, die bei Mitreißen des Chlorids ein Zuviel, bei Festhalten von Chlorwasserstoff im geschmolzenen Chlorid oder an den Wänden der Apparatur ein Zuwenig an Wasser ergibt.

Beim eigentlichen Versuch, der bis zu 48 Std währen kann (Verf.), muß der mit der Versuchszeit in Stunden multiplizierte Blindwert entsprechend berücksichtigt werden (vgl. Tab. 3).

Hingewiesen sei auf die Veröffentlichung von BELCHER, THOMPSON u. WEST[2], in der über das Arbeiten mit dem von diesen Autoren besonders geeignet befundenen Succinylchlorid sowie über ihre Erfahrungen mit p-Toluolsulfonylchlorid, Butyrylchlorid, Trichloracetylchlorid und mit Chlorsilanen berichtet wird. Nach einer privaten Mitteilung von Herrn BELCHER[1] wurde ein noch geeigneteres Reagens als Succinylchlorid gefunden, über das hier noch nichts mitgeteilt werden kann.

Vor allem im Hinblick auf die Elementaranalyse kleiner Mengen ist das Studium solcher Umsetzungen mit einem möglichst hohen Umsetzungsverhältnis Wasser:Reaktionsprodukt erwünscht, um die durch das

Temperieren so subtilen und zeitraubenden Mikrowägungen durch Titration mit Mikrobüretten unter Verwendung von etwa 0,05 n Titerlösungen ersetzen zu können, so daß möglichst rasch nach beendigter Verbrennung der Analysenwert vorliegt. Hier ist sowohl präparativ wie experimentell noch einiges zu tun.

Tabelle 3. *Reproduzierbarkeit und Abweichungen*

Nr.	Substanz	Lit.	Strömungsgeschwindigkeit	Testwasser mg	Abweichung
1	Naphthylphosphinsäuredichlorid	[17]	200—400 ml/Std	0,2— 15	± 0,005 mg
2	α-Naphthylphosphorigsäuredichlorid	[3]	etwa 500 ml + Spülung während 24 Std	50 —100	± 2—3%
3	Zimtsäurechlorid	[19]	?	1,5— 8	+ 1,4%
		[6]	500 ml/15 Std	1 — 10	0,2—3,3 mg
4	Succinylchlorid	[2]	10 ml/min während	2,7— 6,4	± 0,11 mg
		Verf.	einstündiger Verbrennung	2 — 11	± 0,09 mg

Zusammenfassung

Es wird ein Überblick gegeben über die Unterschiede zwischen physikalischen und chemischen Methoden zur Wasserbestimmung in organischen Substanzen sowie über die Voraussetzungen, Eigenschaften und Anwendungen der chemischen Methoden. Im einzelnen werden erörtert als die zur Zeit wichtigsten Verfahren die Karl-Fischer-Titration, die Acetylchloridmethode und die vornehmlich für die Elementaranalyse in Betracht kommenden Umsetzungen des Verbrennungswassers mit anorganischen Chloriden und verflüssigten organischen Säurechloriden.

Literatur

[1] Belcher, R., O. Ottendorfer u. T. S. West: Talanta **4**, 166 (1960); vgl. diese Z. **180**, 288 (1961). — [2] Belcher, R., J. H. Thompson u. T. S. West: Anal. chim. Acta (Amsterdam) **19**, 148 (1958); vgl. diese Z. **168**, 126 (1959). — [3] Bell, R. P.: J. chem. Soc. (London) **1932**, 2903. — [4] Dalbert, R., u. J. Tranchant: Mém. Artillerie franç. **3**, 611 (1953). — [5] Eberius, E.: Angew. Chem. **64**, 195 (1952); vgl. diese Z. **140**, 153 (1953). — [6] Eberius, E.: Maßanalytische Bestimmung kleiner Mengen Wasser, in: Die chemische Analyse, Bd. 33, 4. Aufl., herausg. v. G. Jander, Verlag F. Enke, Stuttgart 1956. — [7] Eberius, E.: Wasserbestimmung mit Karl-Fischer-Lösung, Monographie Nr. 65 zu Angew. Chem. u. Chemie-Ing.-Techn., 2. Aufl., 1958, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. — [8] Eberius, E., u. H. Bohnes: diese Z. **168**, 330 (1959). — [9] Eberius, E., u. W. Kowalski: diese Z. **150**, 13 (1956). — [10] Fischbeck, K., u. E. Eckert: diese Z. **112**, 305 (1938). — [11] Fischer, K.: Angew. Chem. **48**, 394 (1935); vgl. diese Z. **105**, 287 (1936). — [12] Grün, A., u. T. Wirth: Z. dtsch. Öl- u. Fett-Ind. **41**, 145 (1921); vgl. diese Z. **72**, 392 (1927). — [13] Hein, F., u. G. Bähr: Handb. d. analyt. Chem., 3. Teil, Bd. VIIa, α, Verl. Springer, Berlin, S. 111. — [14] Johansson, A.: Svensk. Papperstidn. **50**, 11B, 124 (1947); Acta chem. scand. **3**, 1058 (1949); vgl. diese Z. **132**, 434 (1951). — [15] Jordan, K., u.

W. R. Fischer: diese Z. **168**, 182 (1959). — [16] Kaufmann, H. P., u. S. Funke: Fette u. Seifen **44**, 345, 386 (1937); vgl. diese Z. **116**, 439 (1939). — [17] Lindner, I.: Mikromaßanalytische Bestimmung des Kohlenstoffs und Wasserstoffs usw., Berlin 1935. — [18] Mitchell, jr., J., u. D. M. Smith: Aquametry, Intersci. Publ. Inc., New York-London 1948. — [19] van Nieuwenburg, C. J.: Mikrochim. Acta (Wien) **1**, 71 (1937); vgl. diese Z. **115**, 347 (1938/39). — [20] Peters, E. D., u. J. L. Jungnickel: Analyt. Chemistry **27**, 450 (1955); vgl. diese Z. **149**, 141 (1956). — [21] Raymond, E., u. E. Bouvetier: C. R. Acad. Sci. **209**, 439 (1939). — [22] Smith, D. M., u. W. M. D. Bryant: J. Amer. chem. Soc. **57**, 841 (1935); vgl. diese Z. **105**, 286 (1936).

Dr. E. Eberius, Duisburg-Hamborn, Dahlmannstr. 22

---

2. Elektrochemische Methoden, chemische Methoden mit elektrischer Indikation

Physikalisch-Chemisches Institut der Bergakademie Clausthal

Analyse organischer Verbindungen nach der Methode der Hochfrequenztitration

Von
K. Cruse

Mit 13 Textabbildungen

(Eingegangen am 3. November 1960)

Der Fortschritt der analytischen Chemie spiegelt sich wider in einer steten Verfeinerung bekannter quantitativ-analytischer Methoden einerseits und in der Heranziehung völlig neuer Methoden andererseits. Zu letzteren gehört die sogenannte Hochfrequenztitration, die zunächst sogar hat aufhorchen lassen, da ihr eine zum Teil überraschend gute Eignung zu Präzisionsanalysen zugesprochen wurde, so daß sie auch heute nach einer Entwicklung von etwa 15 Jahren immer wieder auf das besondere Interesse des Analytikers stößt. Allerdings stellt der auf diesem Gebiet erfahrene Analytiker leider oft fest, daß der erfolgreichen Anwendung dieser Methode als entscheidendes Hemmnis entgegensteht, daß allzu oft unumgänglich notwendige einfache Kenntnisse der Hochfrequenztechnik nicht vorliegen und, daß dann mangels Kenntnis der prinzipiellen Zusammenhänge unter diesen Umständen grundsätzlich mögliche, äußerst schlechte Meßerfolge zu verzeichnen sind, ja, zur völligen Ablehnung dieser Methode führen. Es soll daher im folgenden der Versuch unternommen werden, die Voraussetzungen zur Ausschöpfung der Leistungsfähigkeit dieser Methode herauszustellen und in ihrer Bedeutung für die Analyse organischer Verbindungen zu erläutern.

Die mit dem leider viel zu eng begrenzenden Namen „Hochfrequenztitration" belegte Methode ist ihrem Prinzip nach nichts anderes als eine Methode, in der Abhängigkeiten des Wechselstromwiderstandes (der sog. Impedanz) oder des Wechselstromleitwertes (der sog. Admittanz als Kehrwert der Impedanz) von den elektrischen Eigenschaften des Meßgutes analytisch ausgenutzt werden. Die Meßzelle befindet sich dabei als Meßstrecke in der Regel in einem in geeigneter Weise erregten Schwingkreis, sei es in Gestalt einer Kapazität oder auch einer Induktivität, so daß man von Kapazitäts- oder Kondensator-Meßzellen einerseits und von Induktivitäts- oder Spulenzellen andererseits spricht, gegebenenfalls auch von Kombinationszellen, wenn sich die Eigenschaften der Meßstrecke als Kondensator und als Induktionsspule überlagern. Einige Beispiele solcher Meßzellen mit — und das ist charakteristisch — außerhalb der Gefäßwandung befindlichen Kondensatorbelägen oder Spulen sind in Abb. 1 zusammengestellt.

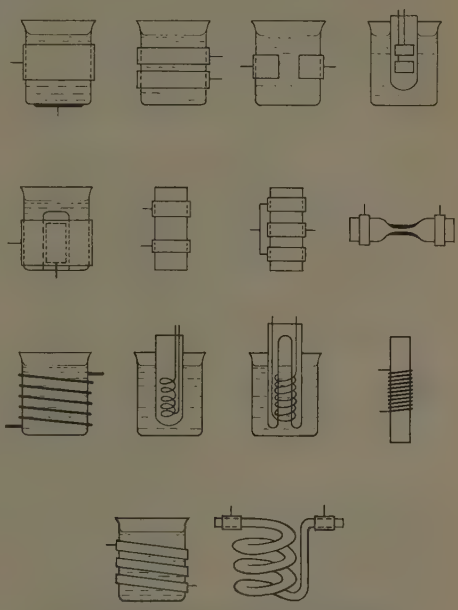


Abb. 1. Meßzellentypen für Hochfrequenztitrationen[5]

Maßgebend für die effektive Größe dieser Schaltelemente als Kapazität oder Induktivität sind, den Gesetzen der Wechselstromtechnik entsprechend, nicht allein die geometrischen Abmessungen sondern auch die Eigenschaften ihrer Füllungen, und zwar grundsätzlich bezüglich deren Ohmscher Leitfähigkeit, bezüglich deren Dielektrizitätskonstante oder gegebenenfalls — in Spulenzellen — auch bezüglich deren Permeabilität. Sämtliche drei Eigenschaften des Meßgutes sind somit auch grundsätzlich nach dieser Methode meßbar und analytisch nutzbar, wenn beispielsweise der Verlauf der Impedanzänderung während einer Titrationsreaktion in einer Meßzelle verfolgt wird.

Mit diesen wenigen Worten ist das Prinzip der Methode bereits beschrieben. Zu berücksichtigen sind bei der praktischen Anwendung der Methode allerdings noch einige grundsätzlich wichtige meßtechnische

Zusammenhänge. Impedanzen und Admittanzen können bekanntlich als sogenannte komplexe Größen, die sich aus Real- und Imaginäranteilen zusammensetzen, nicht nur durch Bestimmung ihres Absolutbetrages festgestellt werden, sondern auch nach Meßverfahren, die entweder vorwiegend den Wirkanteil oder speziell den Blindanteil erfassen, die ihrerseits beide genauso gut als Kennzeichen der Veränderung von Impedanzen oder Admittanzen dienen. So sind auch für alle drei Möglichkeiten entsprechende Titrimeter entwickelt worden, die entweder nach dem sogenannten Ausschlagverfahren oder nach dem Wirk- oder Blindkomponentenverfahren (AV, WKV und BKV) zu arbeiten erlauben. Die handelsüblichen Geräte sind in Tab. 1 zusammengestellt.

Tabelle 1. *Hochfrequenztitrimeter des Handels*[5]

Bezeichnung des Titrimeters	Hersteller und Bezugsquelle	Arbeitsfrequenz	Meßverfahren
Dephimeter	Draeger-Werke, Lübeck	0,05—5 MHz	WKV
Oscillometer V	Sargent u. Co., Chicago, USA (Dr. Virus, Bonn)	5 MHz	BKV
Jensen-Titrator	Sargent u. Co., Chicago, USA (Dr. Virus, Bonn)	4,5 MHz	AV
Hochfrequenztitrimeter HFT-30 C.	Wiss.-Techn.-Werkstätten G.m.b.H., Weilheim/Obb.	30 MHz	WKV BKV, AV
Oscillometer DSM	Export Agencies van Drenthem, Den Haag (Ruhstrat AG., Göttingen)	8—18 MHz	WKV
Radio-frequency-titrimeter	Morgan Crucible Co. Ldt., London	2 MHz	WKV
Proximity-Meter	Fielden Electronics Ldt., Manchester	0,5 oder 28 MHz	BKV
HF-Titriergerät nach Pungor	Metrimpex, Budapest (W. Haupt, Frankfurt a.M.)	125 MHz	WKV
Titrimètre par Hautes Frequences	Touzart et Matignon, Paris	3 MHz	WKV

Es kommt durch die Wahl des Meßverfahrens noch ein weiterer grundsätzlich bedeutender Zusammenhang zur Geltung: Charakteristisch für diese Meßverfahren ist, daß die Impedanz (und ihr proportionale Meßgrößen) den elektrischen Eigenschaften einer Zellfüllung nicht linear proportional ist, daß vielmehr Bereiche verschieden großer Meßempfindlichkeit bestehen, wie in Abb. 2 veranschaulicht ist. Sowohl in Kapazitäts- wie in Spulenzellen werden bei Messungen nach einem Blindkomponentenverfahren somit stets S-förmige „Kennkurven" erhalten, wenn z. B. allein die Leitfähigkeit einer Zellfüllung verändert wird. Die entsprechende Kennkurve für das Wirkkomponentenverfahren ist dem-

gegenüber glockenförmig. Es resultieren also sogenannte Optimalbereiche, die sich bei Verwendung ein und derselben Meßanordnung für beide Meßverfahren vorteilhaft ergänzen, so daß die Leitfähigkeit in einem Bereich von etwa 6 Zehnerpotenzen empfindlich meßbar ist. Werden z.B. Titrationen ausgeführt, bei denen die Titrationsreaktion nur Leitfähigkeitsänderungen bewirkt, so sind spitze Schnittwinkel der Titrationskurven nur innerhalb der Optimalbereiche erzielbar, was notfalls durch Übergang vom Wirkkomponentenverfahren zum Blindkomponentenverfahren sichergestellt werden kann. Da die Lage dieser Optimalbereiche aber nicht allein der verwendeten Arbeitsfrequenz proportional ist, sondern entscheidend von der Dimensionierung der Meßstrecke abhängt, kann allerdings grundsätzlich nur dann empfindlich gemessen werden, wenn auch eine Anpassung der Meßzelle auf den Absolutwert der infrage kommenden Leitfähigkeiten erfolgt ist.

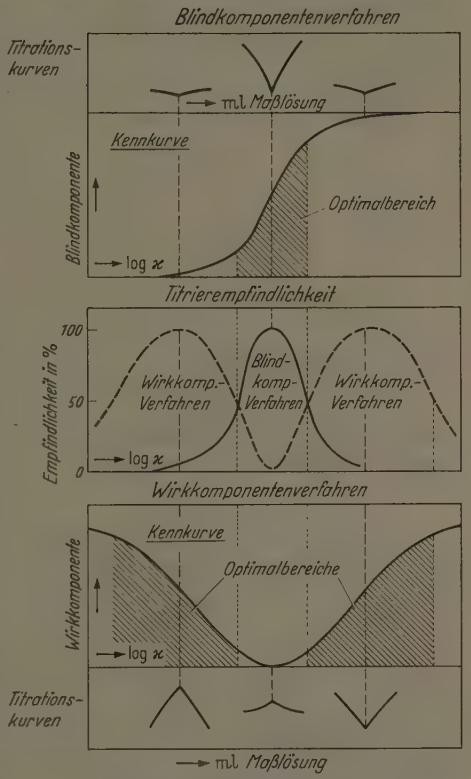


Abb. 2. Kennkurven, Meßempfindlichkeiten und Titrationskurven für Hochfrequenztitrationen[4]

Auch unter diesen Umständen können natürlich bei sehr starken Leitfähigkeitsänderungen während der Titrationsreaktion auch unempfindliche Kennkurvenbereiche durchschritten werden, so daß die Gestalt einer Titrationskurve stark modifiziert sein kann und in vielen Fällen keineswegs dem aus der klassischen Konduktometrie bekannten Bild entspricht, eine Erscheinung, die in den Anfängen der Methode keineswegs überblickt wurde und die durch Abb. 3 veranschaulicht wird.

Dem Blindkomponentenverfahren sehr ähnliche Zusammenhänge gelten für Messungen nach der Ausschlagmethode in kapazitiven Meß-

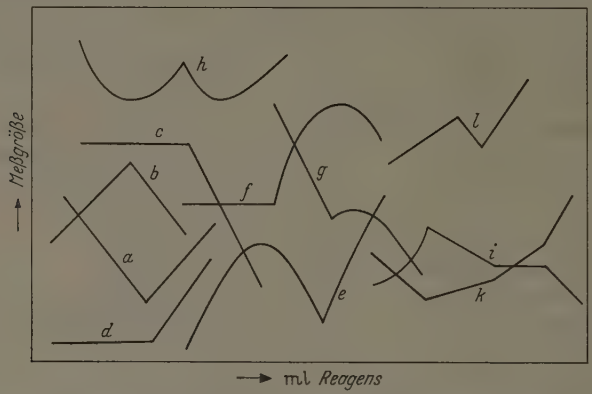


Abb. 3. Typische Titrationskurven[7]. Kurven *a*—*d*, *i*, *k* für Leitfähigkeitsänderungen im Optimalbereich, Kurven *e*—*h* in der Nähe des Kennkurvenmaximums, Kurve *l* bei Löslichkeitsüberschreitung

zellen. Auch bei diesem Meßverfahren werden S-förmige Kennkurven erhalten, ihr Verlauf — nach rechts oder links abfallend — hängt aber von den meßtechnischen Ausgangsbedingungen ab, die dann auch für die gesamte Höhe des Anstieges oder Abfalls der Kurven maßgebend sind, während diese Höhe beim Blindkomponentenverfahren nur von den Eigenschaften der Meßzelle, beim Wirkkomponentenverfahren auch von der Arbeitsfrequenz abhängt[8,16].

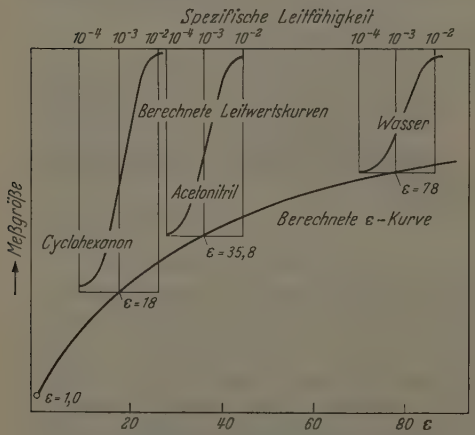


Abb. 4. DK-Eichkurve und Leitfähigkeitskennkurven in Abhängigkeit von der DK des Lösungsmittels[8]

Neben der Beobachtung von Leitfähigkeitsänderungen sind in kapazitiven Meßzellen bei Messung nach dem Blindkomponentenverfahren auch zuverlässige DK-Messungen möglich, wenn nur die Meßzelle in ihrer Dimensionierung entsprechend angepaßt ist.

Die empfindliche Messung von Leitfähigkeiten *und* Dielektrizitätskonstanten in ein und derselben Zelle ist grundsätzlich nicht möglich.

DK-Meßmethoden sind in großer Zahl bekannt. Messungen nach der Methode der Hochfrequenztitration unterscheiden sich grundsätzlich nur dadurch, daß hier Meßzellen verwendet werden, bei denen die Kondensatorbeläge keinerlei galvanischen Kontakt mit dem Meßgut besitzen, so daß auch labile, leicht zersetzliche Systeme der DK-Messung und natürlich auch der Leitfähigkeitsmessung zugänglich sind. Die Eichkurve bei Verwendung sogenannter „elektrodenloser" Meßzellen gleicht im übrigen derjenigen bei üblichen Messungen (Abb. 4). Für Anwendungen der Hochfrequenztitration ergibt sich aber zugleich aus Abb. 4 noch ein weiterer grundsätzlich wichtiger Zusammenhang: Durch Verändern der DK einer Lösung können die Leitfähigkeitskennkurven um so höher gestreckt werden, je geringer die DK der Lösung eingestellt wird. Der oberste Anzeigewert dieser Kennkurven kann maximal nur den Wert für eine metallisch leitende Füllung erreichen, ihr Fußpunkt aber sinkt mit der DK der Lösung. Gerade dieser Zusammenhang verdient das besondere Interesse des Organikers, folgt hieraus doch, daß ein konstanter Leitfähigkeitsunterschied in organischen Lösungsmitteln empfindlicher meßbar ist als in Wasser, und daß im übrigen die Anpassung einer Meßzelle auch durch Verändern der DK verbessert werden kann, sogar dann, wenn damit zugleich Leitfähigkeitsverschlechterungen verknüpft sind. Ein sehr schönes Beispiel hierfür ist die Abhängigkeit des Titrationskurvenbildes bei Titration von Dicarbonsäuren in Benzol mit Natriummethylat in Methanol vom Methanolzusatz in Abb. 5, d. h. bei von Kurve *1* nach Kurve *4* steigender DK der Lösung: nur bei mittlerer DK sind beide Äquivalenzpunkte in der verwendeten Meßzelle feststellbar.

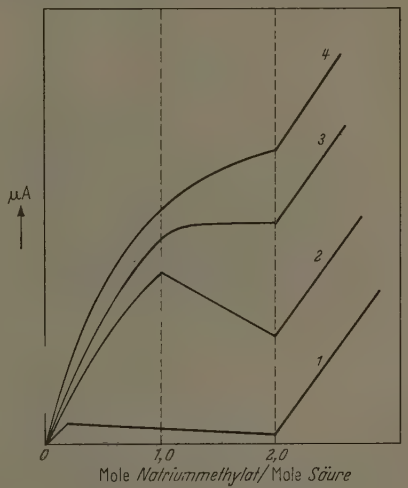


Abb. 5. Titration von Dicarbonsäure in Benzol mit Natriummethylat in Methanol nach MASUI[12]

Neben diesen grundsätzlich und besonders für den Analytiker in der organischen Chemie wichtigen Zusammenhängen bei Verwendung dieser Methode sei in aller Kürze auf den hervorstechendsten Vorteil, auf die

überaus einfache Meßtechnik eingegangen: Soll z. B. eine Titration ausgeführt werden, so besteht die Handhabung der Messung im wesentlichen

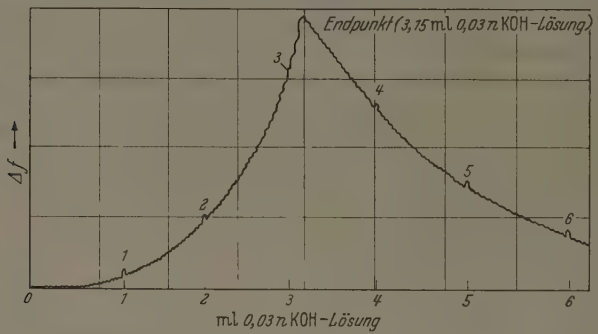


Abb. 6. Registrogramm für die Titration von HCl- mit KOH-Lösung mit Hochfrequenz[9] (Vollausschlag $\Delta f = 30$ KHz)

daraus, daß zu Beginn und nach jeder Reagenszugabe am Gerät eine Einstellung auf Resonanz zu erfolgen hat, die leicht am maximalen Ausschlag eines Meßzeigers erkennbar ist. Die Stellung des Zeigers im Maximum ist dann ein Maß für den Reaktionsfortschritt bei Messungen nach dem Wirkkomponentenverfahren, die zu dieser Resonanzeinstellung erforderliche Änderung der Stellung eines Drehkondensators entsprechend für Messungen nach dem Blindkomponentenverfahren, sofern nicht spezielle Kompensationsschaltungen verwendet werden, bei denen auf eine Zeigerstellung Null einzustellen ist oder sofern nicht mit Überlagerungsgeräten wie bei DK-Messungen gearbeitet wird, bei denen dann in der Regel eine Differenzfrequenz als Meßgröße dient.

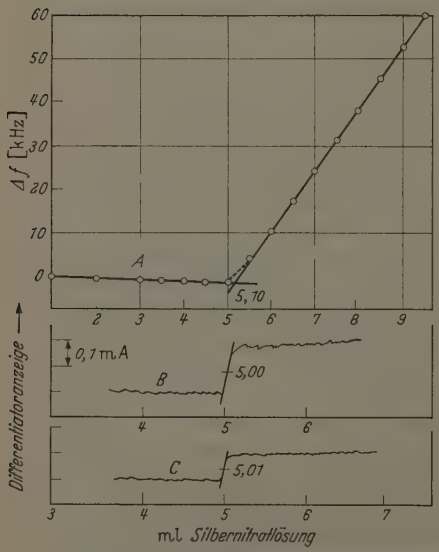


Abb. 7. Automatisch registriertes Titrationsdiagramm in 1. Ableitung bei Titration von Kaliumrhodanid- mit Silbernitratlösung[8]

Noch einfacher gestalten sich Messungen nach dem Ausschlagverfahren: Hier wird

lediglich zu Beginn der Analyse auf Resonanz eingestellt, im Verlauf der Titration aber ist keinerlei Bedienung des Gerätes, sondern nur noch die Ablesung einer Zeigerstellung erforderlich. Hier ist somit wie im übrigen auch bei den anderen Meßverfahren die automatische Registrierung des Reaktionsverlaufs besonders einfach möglich.

Ein solches Registrogramm für eine acidimetrische Titration nach dem Blindkomponentenverfahren ist in Abb. 6 wiedergegeben. In Abb. 7 ist veranschaulicht, wie dieser Kurvenverlauf mit geringem Aufwand auch differentiell registriert werden kann, wodurch die Ablesung des Äquivalenzpunktes noch sehr erleichtert wird.

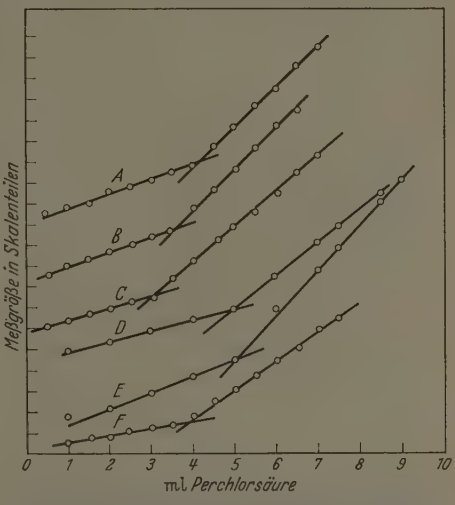


Abb. 8. Hochfrequenztitration substituierter Aniline in Eisessig mit Perchlorsäure[11]. *A* p-Anisidin; *B* p-Toluidin; *C* p-Chloranilin; *D* p-Aminoacetophenon; *E* p-Aminobenzoesäure; *F* p-Bromanilin

Der Schwerpunkt des Anwendungsbereichs der Methode auf dem Gebiet der Analyse organischer Verbindungen liegt heute noch auf dem der Titration, da sich die Hochfrequenztitration ausgesprochen gut zur Analyse in organischen Medien, speziell zur Analyse wasserunlöslicher Verbindungen eignet. An erster Stelle sind hier acidimetrische Titrationen zu nennen, die in einer auch in Tabellenform kaum noch zusammenfaßbaren Fülle beschrieben wurden[7]. Wohl beschränkten sich diese Analysen vornehmlich auf Lösungen in Eisessig, Methanol, Methanol-Benzolgemischen, Pyridin und in Dimethylformamid, doch läßt sich die Anwendung ohne weiteres auch auf andere Lösungsmittel ausdehnen, da hierzu keinerlei grundsätzliche Bedenken bestehen. Sehr viel interessanter ist in diesem Zusammenhang, daß auch zuverlässige Analysen von Säuren und Basen mit äußerst geringer Dissoziationskonstante gelingen, wie z. B. nach Abb. 8 für Titrationen substituierter Aniline mit Perchlorsäure in Eisessig oder bei Analysen von Alkaloiden[13], und daß darüber hinaus bei Titrationen mehrbasischer Säuren oder mehrwertiger Basen auch mehrere Äquivalenzpunkte feststellbar sind, wie bereits in Abb. 5 zum Ausdruck kam.

Die Möglichkeit der quantitativen Analyse durch Titration beschränkt sich dabei keineswegs auf Carbonsäuren oder Amine als Säuren und Basen, auch aprotische Verbindungen, ja auch üblicherweise als echte Salze bekannte Substanzen wie Acetate, Borate, Tartrate, ja sogar Alkylammoniumsalze sind acidimetrisch mit Perchlorsäure in Eisessig ausgezeichnet titrierbar[10], von der Möglichkeit einer argentometrischen Bestimmung der letzteren ganz abgesehen. Ob es sich im übrigen um substituierte Aniline, um ein Amin oder um ein Diamin, Guanidin, Phenacin, Benzidin, Chinoxalin, Sulfanil, Sulfathiazol, um Phenole oder Nitrophenole, Kresole, Naphthole, um Resorcin, Hydrochinon oder Pyrogallol oder um Alkaloide handelt — um nur eine stichwortartige Auswahl zu nennen — in allen Fällen werden gute Ergebnisse erhalten, sofern nicht durch Einbau von Substituenten eine Erniedrigung der Dissoziationskonstante auf Werte unterhalb 10^{-10} bis 10^{-12} bewirkt wurde. Perchlorsäure als saure und Alkoholate der Alkalimetalle, Tetraalkylammoniumhydroxyd oder Lithiumhydroxyd als basische Maßlösungen fanden hierbei stärkste Anwendung.

Die Anwendung der Methode zu Titrationen gewinnt noch an Bedeutung, wenn auch indirekte Titrationsreaktionen genannt werden, für die hier als Beispiel die Bestimmung von Mercaptanen nach Absorption in Natronlauge und Titration des Mercaptids mit Bleiacetat in wäßriger oder pyridin-haltiger Lösung als typisches Beispiel angeführt sei[15].

Der Anwendungsbereich der Hochfrequenztitration zur Analyse organischer Verbindungen läßt sich durch Einbeziehen von Fällungs- und komplexometrischen Titrationen noch erheblich erweitern. Es sei hier nur an die Bestimmung von Oxin mit Metallkationen oder an das Dimethylglyoxim, an Phenylendiamin, an die Komplexone, an Kupferron, Nitroso-R-Salz, an das Dithizon, an Oxytetracyclin oder Tetraphenylbor und an die Fülle aller übrigen organischen Verbindungen erinnert, die bei Umsatz mit Metallionen zu Fällungs- und Komplexverbindungen eindeutiger stöchiometrischer Zusammensetzung führen und daher durch Titration mit Metallkationen ebenso gut bestimmt werden können, wie die Metallionen selbst, sei es nun in direkter Reaktion oder sei es indirekt und durch Titration entstandener Nebenprodukte. Hervorgehoben werden muß in diesem Zusammenhang der besonders vorteilhafte Umstand daß keinerlei Elektroden in die Lösungen eintauchen, daß Fällungen also auch keinerlei Fehlresultate verursachen können, selbst dann nicht, wenn Suspensionen analysiert werden und wenn in diesen womöglich zwei Fällungsreaktionen hintereinander, also Simultanbestimmungen ausgeführt werden, ohne daß inzwischen filtriert wird.

Die Möglichkeit der Ausführung so zahlreicher Analysen stellt der Methode noch kein Leistungszeugnis aus, wenn nicht auch die erreichbare Genauigkeit zufrieden stellt. Diese sehr entscheidende Frage kann

jedoch ebenfalls positiv beantwortet werden. Wohl darf eine Einschränkung grundsätzlicher Art nicht verschwiegen und muß besonders herausgestellt werden: Der klassischen Maßanalyse mindestens ebenbürtige Genauigkeiten werden mit Sicherheit nur dann erzielt, wenn die mit Rücksicht auf die prinzipiellen Abhängigkeiten der Meßmethode erforderliche Anpassung der Anordnung auf den optimalen Meßbereich auch wirklich sichergestellt ist. In der zu geringen Berücksichtigung dieser Voraussetzung liegen die meisten enttäuschenden Mißerfolge bei Anwendung dieser Methode begründet.

Tabelle 2. *Anwendung der Hochfrequenztitration als Untersuchungsmethode*

Anwendungsbereich	Untersuchungen über
Maßanalyse	chemische Äquivalenzen
Reaktionskinetik	Verseifungsgeschwindigkeit; Veresterungsgeschwindigkeit; Hydrolysiergeschwindigkeit; Polymerisationen; Antoxydationen; Diffusionsvorgänge; Zerfallreaktionen; Kristallisationsgeschwindigkeit; Auflösungsgeschwindigkeit; Sedimantationen; Photochemische Umsetzungen
Phasenanalyse	Schmelzvorgänge; Kristallisation; Auflösung von Salzen; Entmischungen; Phasenumwandlungen; Zustandsdiagramme; Heterogenreaktionen
Chromatographie an Säulen auf Papier	Trennung in farblose Zonen Austauschmechanismen Trennung von Ionen
DK-Metrie	binäre und ternäre flüssige und feste Systeme; Wassergehaltsbestimmungen in flüssigen und festen Substanzen; Strukturanalyse; Alterung von Ölen
Leitfähigkeitsmessung	Reinheitsprüfung; Konstanz von Zusammensetzungen
Technik	zerstörungsfreie Werkstoffprüfung; Überwachung von Produktionen; Regelung von Reaktionsabläufen; Prüfung von Fertigprodukten; Niveauhaltung; Kontrolle von Temperatur oder Druck; Kontrolle von Schüttgütern

Mit der Anwendung der Hochfrequenztitration auf dem Gebiet der Maßanalyse ist ihre Bedeutung für die Analyse organischer Verbindungen keineswegs erschöpft. Überzeugt man sich von der gesamten und überraschend großen Anwendungsbreite der Methode, die in Tab. 2 stichwortartig aufgeführt ist, so lassen sich noch interessante und auch für den organischen Analytiker wertvolle Verwendungsmöglichkeiten feststellen. Dies gilt in ausgesprochenem Maße für das gesamte Gebiet der Reaktionskinetik, da der Reaktionsablauf laufend und ohne jegliche Probenahme

sehr einfach beobachtbar, ja sogar registrierbar ist, und da die einfache Meßtechnik auch die Untersuchung so schnell ablaufender Reaktionen zuläßt, daß Halbwertzeiten von nur wenigen Sekunden noch bestimmbar sind. Die Reihe der zur Kinetik aufgeführten Untersuchungen läßt darüber hinaus erkennen, daß es sich in gleicher Weise um an Leitfähigkeits- oder an DK-Änderungen allein beobachtbare Vorgänge handeln kann, aber auch um solche, bei denen sich beide Eigenschaften ändern, da die Methode grundsätzlich auch Mischeffekte anzeigt. Letztere dürften beispielsweise auch bei Fällungen durch Überschreiten von Löslichkeitsprodukten im Spiele sein, wodurch die Methode z. B. auch zur Bestimmung von Löslichkeiten in organischen Medien nützlich wird (Abb. 3, Kurve *1*).

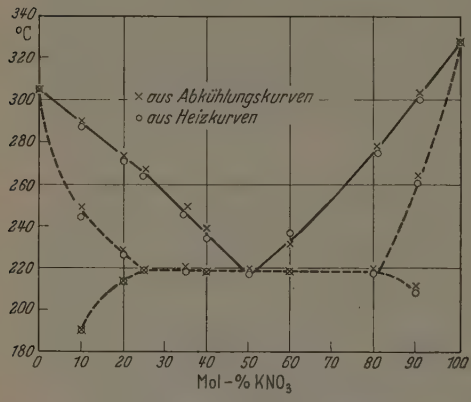


Abb. 9. Mit Hochfrequenz bestimmtes Zustandsdiagramm des Systems KNO_3-$NaNO_3$[9]

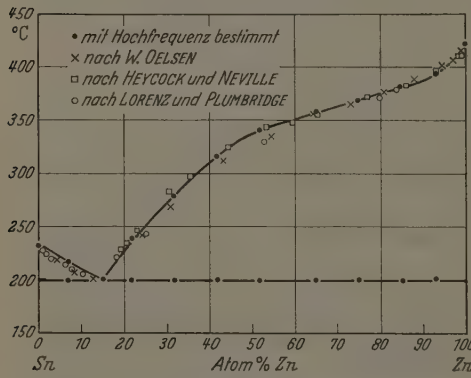


Abb. 10. Mit Hochfrequenz bestimmtes Zustandsdiagramm des Systems Sn-Zn[10]

Die Möglichkeit der Beobachtung von Kristallisationsgeschwindigkeiten bei Metallen, Salzen, Harzen oder z. B. an Perlon, auch an rein organischen Substanzen, sowie die Möglichkeit der Feststellung von Phasenübergängen weist bereits auf den Wert der Methode bei Ermittlung von Zustandsdiagrammen hin, die an organischen Verbindungen zwar noch nicht beschrieben wurden, für das System Kaliumnitrat-Natriumnitrat aber in Abb. 9 wiedergegeben ist. Die absolute Größe des Eigenleitvermögens solcher Systeme stellt heute auch dann keinerlei Schwierigkeit mehr dar, wenn es sich um Metallegierungen handelt, wie Abb. 10 zeigt, und erst recht nicht

bei organischen Verbindungen mit ihren in der Regel sehr geringen Leitfähigkeiten. Der entscheidende Wert dieser Untersuchungsmethode besteht darin, daß hier eine von calorischen Effekten völlig unabhängige Untersuchungsmethode zur Verfügung steht, die frei ist von allen Nachteilen der Thermoanalyse.

Sieht man von der DK-Metrie als weiteren Anwendungsbereich der Hochfrequenztitration in der organischen Chemie ab, zumal derartige Messungen noch in der Regel mit den bisher üblichen Methoden ausgeführt werden, so tritt als besonders interessanter analytischer Anwendungsbereich noch die Chromatographie hervor. Hier liegt die Methode

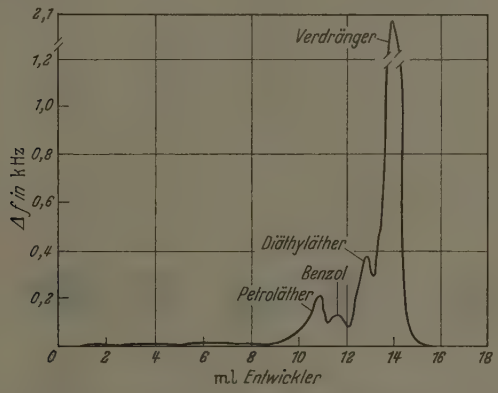


Abb. 11. Mit Hochfrequenz aufgenommenes Elutionsdiagramm von MONAGHAN u. Mitarb.[14]

noch in einer Anfangsentwicklung. Geht man davon aus, daß sich Leitfähigkeits- und DK-Änderungen oder auch Mischeffekte durch Impedanzänderungen anzeigen und legt man daher z.B. zwei Kreissegmente als Kondensatorplatten um eine chromatographische Säule, so ist zu erwarten, daß sich Eluierzonen oder auch Ionenzonen in ihrer Wanderung auch dann erkennen lassen, wenn sie ungefärbt sind. Beispiele für die Anwendung der Methode zu chromatographischen Analysen an der Säule sind in den Abb. 11 u. 12 wiedergegeben, von denen in letzterer sogar ein automatisch aufgenommenes Registrogramm enthalten ist. Auch papierchromatographische Analysen sind nach dieser Methode möglich, wie bereits vor langer Zeit vom Mitbegründer der Methode G. G. BLAKE an der Analyse von Kupferchloridflecken gezeigt wurde. Nach Abb. 13 lassen sich auch Flecken verschiedener Formen bei gleichem Inhalt hochfrequenz-analytisch richtig auswerten. In dieser Richtung steht der weiteren Forschung noch ein großes Feld offen.

Eine Übersicht über die Anwendung der Hochfrequenztitration zur Analyse organischer Verbindungen soll nicht abgeschlossen werden, ohne

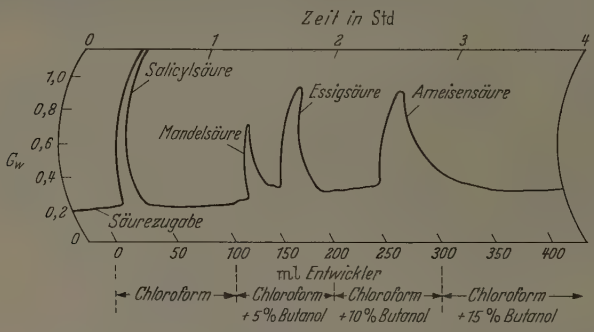


Abb. 12. Mit Hochfrequenz aufgenommenes Registrogramm einer chromatographischen Trennung von Baumann u. Blaedel[1]

auch auf deren Verwendung bei mikroanalytischen Arbeiten hinzuweisen, die sich gerade bei organisch-analytischen Untersuchungen bei wertvollen

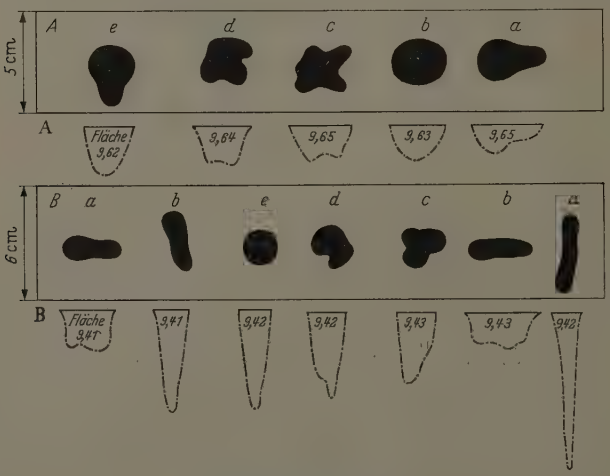


Abb. 13. Mit Hochfrequenz nach Blake[3] gemessene Fleckengröße von Kupfer(II)-chlorid auf Papierchromatogrammen

Präparaten oft nicht umgehen läßt. Hierzu kann festgestellt werden, daß trotz der bereits erwähnten notwendigen Anpassung wegen der Abhängigkeit der Impedanz von der Dimensionierung der Meßzelle auch Zellkonstruktionen herstellbar sind, deren Inhalt nur wenige Milliliter um-

faßt und in denen trotzdem vorzügliche Meßempfindlichkeiten und Analysiergenauigkeiten erreicht werden. Beispiele hierfür sind sowohl an Titrationen[17] wie für kinetische Messungen[18] bereits beschrieben worden.

Literatur

[1] Baumann, F., u. W. J. Blaedel: Analyt. Chemistry **28**, 2 (1956); vgl. diese Z. **152**, 439 (1956). — [2] Blaedel, W. J., u. H. V. Malmstadt: Analyt. Chemistry **24**, 455 (1952); vgl. diese Z. **139**, 43 (1953). — [3] Blake, G. G.: Anal. chim. Acta (Amsterdam) **15**, 232 (1956); vgl. diese Z. **156**, 34 (1957). — [4] Cruse, K.: Chem. Rundschau **11**, Nr. 18 (1958); Dechema-Monogr. Bd. **31**, 99 (1958). — [5] Cruse, K. Hochfrequenztitration, in Ullmanns Enzyklopädie d. techn. Chem., 3. Aufl., Bd. II/1, Urban & Schwarzenberg, München, im Druck. — Siehe auch Cruse, K.: Chimia (Zürich) **14**, 97 (1960). — [6] Cruse, K.: Z. Elektrochem. Ber. Bunsenges. physik. Chem. **61**, 1123 (1957). — [7] Cruse, K., u. R. Bertram: Hochfrequenztitration, in: Analyse der Metalle, Bd. 2, Springer-Verlag, im Druck. — [8] Cruse, K., u. R. Huber: Hochfrequenztitration, Monogr. Nr. 69 zu Angew. Chem. u. Chem.-Ing.-Techn., Verlag Chemie, Weinheim 1957. — [9] Cruse, K., B. Ricke u. R. Huber: Forschgs.-Ber. d. Wirtsch. u. Verkehrs.-Min NRW Nr. 309, Westdeutscher Verlag Opladen 1956. — [10] Lane, E. S.: Analyst **80**, 675 (1955); vgl. diese Z. **152**, 300 (1956). — [11] Lippincott, W. T., u. A. Timnick: Analyt. Chemistry **28**, 1690 (1956); vgl. diese Z. **157**, 456 (1957). — [12] Masui, M.: J. pharm. Soc. Japan **75**, 1519 (1955); vgl. diese Z. **154**, 133 (1957). — [13] Masui, M., H. Sayo u. Y. Wada: J. pharmac. Soc. Japan **76**, 1011 (1956); vgl. diese Z. **157**, 228 (1957). — [14] Monaghan, P. H., P. B. Moseley, T. S. Burkhalter u. O. A. Nance: Analyt. Chemistry **24**, 193 (1952); vgl. diese Z. **137**, 368 (1952/53). — [15] Oehme, F.: Erdöl u. Kohle **13**, 394 (1960). — [16] Ricke, B., u. K. Cruse: Z. Instrumentenkunde **68**, 293 (1960); **69**, 11, 39 (1961). — [17] Tanaka, N., u. M. Nishigai (NH_3-Bestimmung): Rep. Radiation Lab. **6**, 131 (1952). — Masui, M., u. Y. Kamura (Säure-Basen): J. pharmac. Soc. Japan **71**, 705 (1951). — Bien, G. S. (Sulfat-Chlorid-Simultanbestimmung): Analyst. Chemistry **26**, 909 (1954); vgl. diese Z. **145**, 145 (1955). — [18] dalla Venezia, G.: Contrib. Teorici e Sperimentali di Polarografia **2**, 383 (1956). — Elving, P. J.: Discuss. Faraday Soc. **17**, 156 (1954). — [19] Weber, Th., u. K. Cruse: diese Z. **166**, 333 (1959).

Prof. Dr. K. Cruse, Physikal.-Chem. Institut d. Bergakademie, Clausthal-Zellerfeld, Adolf Römer-Str. 2A

Analytical Section of the Institute of Organic Chemistry, University of the Saar, Saarbrücken

Application of Polarovoltric End-Point Determination to Titration of Organic Compounds

By

M. R. F. Ashworth and W. Walisch

(Received October 14, 1960)

Under the term ‚polarovoltric' end-point determination is understood the method in which is measured the variation of potential difference between small platinum electrodes in a stirred solution, using a

small voltage of the order of 3 volts, applied to the electrodes through a high resistance of the order of $5 \cdot 10^5$ ohms[16].

In the present work, this method has been applied to a number of titrations of organic compounds. The titrations have been essentially exploratory in most cases and full details not yet worked out.

Experimental

The apparatus used was the commercially available 'Titravit', based on the principle mentioned and equipped with sensitivity positions ranging from 0.1 to 1 scale division deflection per millivolt.

The electrodes were of platinum wire of diameter 0.5 and length 4 or 8 mm. After each titration they were immersed in concentrated nitric acid and then washed with distilled water. From time to time they were brought briefly to red heat in a small flame. These treatments maintain the electrodes in an active state and are particularly to be recommended during precipitation titrations.

The solutions titrated were magnetically stirred.

Products of analytical purity or purified by simple distillation or crystallisation were used.

Procedure

15—25 ml solution were titrated. The solutions were buffered with saturated borax solution (p_H 9.2); disodium hydrogen phosphate/acetic or hydrochloric acid (p_H 6 to 8); or acetic acid/sodium acetate (p_H 3.6 to 5.6). Dilute acetic acid solutions were also used (p_H 2.4 to 2.9).

In some precipitation titrations, a few drops of 2% aqueous solution of the colloid stabiliser polyvinyl pyrrolidone were added to prevent coagulation of the precipitate and its adhering to the electrodes. During titrations with iodine reagent, some potassium iodide was added before titration in order to minimise the change in potential difference caused at the beginning of titration by the depolarising effect of the iodide ions formed during the titration reaction or added with the reagent.

The procedure was usually to titrate at moderate to slow speed, allowing time for chemical and electrical equilibrium to be established (especially important in the neighbourhood of the end-point), and to note the cumulative deflection of the instrument millivoltmeter needle as a function of the volume of titrant added. Occasionally, more especially in very dilute solution (below about $2 \cdot 10^{-4}$ M), the data were plotted and the end-point was taken as the point of maximum gradient of the titration curve. More commonly, a clearly-defined deflection occurred which obviated the need for graphical evaluation. Blank titrations were conducted under the same conditions and their value allowed for.

Automatic titration was carried out in some instances, the burette outlet being magnetically controlled by the movement of the instrument needle across a point as near as possible to the point of maximum gradient on the deflection/titrant curve

Results

1. Titrations with Iodine

The method is eminently suitable for titration with this reagent on account of its strong depolarising character, bringing a high instrumental response. It takes part in several types of reaction such as substitution, oxidation and ion combination (with tri-iodide) and examples are given here of each type.

Substitution. The only references to direct titration procedures with iodine, based on substitution, are with antipyrine, using a visual end-point[2] and with resorcinol, using amperometric end-point determination[3]; some older titrations of gallic and tannic acids[7] using external starch/iodide indicator, probably involve oxidation as well as substitution.

A number of phenols and aromatic amines were titrated in the present work and the results are summarised in Table 1.

Table 1. *Titrations with Iodine Solution*

Compound titrated	p_H	Concentration (millimol/litre)	Mols iodine/mol compound
Resorcinol	5 to 9.2 (best 5.6)	0.2 to 0.4	2.99
Orcinol	9.2	0.5	2.86
Pyrogallol	6 to 7.5	0.5 to 5	2.94
m-Cresol	9.2	0.5	2.76 2.94 (rev.)
Gallic acid	9.2	0.5 to 1	2.15
m-Aminophenol	9.2	0.5	2.9
m-Phenylenediamine	9.2	0.5	1.1

Reaction speeds varied but were in general adequate for titration. Phenol and benzidine were also tried but reaction was impracticably slow. Generally speaking, speed diminished with increasing acidity.

As is seen, most of the phenols reacted with sensibly three mols iodine, evidently yielding tri-substitution products. Gallic acid reacted with rather more than 2 and m-phenylenediamine with one. It was qualitatively observed that resorcinol at $p_H \approx 4$ reacted relatively fast with 1 mol iodine and that further substitution proceeded more slowly.

The low results with m-cresol were improved by reverse titration, but there is then a marked danger of over-titration with such a slow reaction.

It is not clear how far oxidation occurs with pyrogallol and gallic acid but results were reasonably reproducible.

Determination of phenols with iodine has a marked advantage over the corresponding determination with bromine. It is more specific and less liable to cause disturbing side reactions of addition or oxidation.

Oxidation. Most known titration procedures with iodine depend on oxidation reactions. The best examples are of ascorbic acid, hydroquinone and mercaptans.

In the present investigation, some substituted hydrazines, hydrazobenzene and uric acid have been examined. There are few references to previous titrations of hydrazines with iodine; only water-soluble hydrazines[13] and dialkyl hydrazines[8,12] appear to have been studied. The examples chosen here are aromatic. The titration of uric acid with iodine is known but in all but one case[15] has been with a visual end-point determination.

The results obtained are given in Table 2.

The general tendency to a stoichiometry of 1 mol hydrazine to 2 iodine is seen from the table. This agrees with the probable equations of:

$$R \cdot NH \cdot NH_2 + 2\,I_2 = R \cdot I + N_2 + 3\,HI \text{ or}$$

$$R \cdot NH \cdot NH_2 + 2\,I_2 + H_2O = R \cdot OH + N_2 + 4\,HI \text{ or even}$$

$$Ar \cdot NH \cdot NH_2 + 2\,I_2 = (Ar \cdot N_2)^+ I' + 3\,HI\,.$$

The lower results in borax buffer may be due to the increased tendency to atmospheric oxidation in the more alkaline solution or to some specific property of the buffer itself. Tests were not made with other buffers since the p_H range for a suitable method is evidently wide enough. The slightly low results for phenylhydrazine are probably to be attributed to air oxidation; solutions rapidly became brown on standing.

Table 2. *Oxidation Titrations with Iodine Solution*

Compound titrated	p_H	Concentration (millimols/litre)	Mols iodine/mols compound
Phenylhydrazine	ca. 2.2	0.25 to 1	1.94
p-Brombenzhydrazide	9.2	0.25 to 1	1.70
	3.6 to 8.1		2.02
2.4-Dinitrophenylhydrazine	9.2	0.25 to 1	1.44
	5.6 to 8.1		1.98
	4.6		1.92
	3.6		1.90
Hydrazobenzene	5.6 to 9.2	0.5 to 1	~0.8
Uric acid	7.0 to 7.5	0.5 to 2.5	1.05

As with the phenols, reaction speeds decreased with increasing acidity. This probably explains the small fall-off in titration of the dinitrophenylhydrazine at higher acidities where reaction was perhaps not quite complete.

No suitable results could be obtained with p-nitrophenylhydrazine. Titrations were low at all p_H values from 9.2 to 25% acetic acid, the stoichiometry falling very nearly to 1:1 at p_H 2.4. Possibly the competing reaction of:

$$R \cdot NH \cdot NH_2 + I_2 = R \cdot H + N_2 + 2\,HI$$

becomes significant.

It was notable that the titre of solutions of 2.4-dinitrophenylhydrazine in methanol/hydrochloric acid fell rapidly on standing, often as much as 50% in a few hours. Acetonitrile was an excellent solvent for this compound, yielding a stable solution.

The low results with hydrazobenzene are almost surely due to the rapid air oxidation. It was difficult to prepare pure on this account and it was noted that if the solutions were allowed to stand or stirred a minute or two before titrating, the results were appreciably lower still.

The expected reaction is:

$$C_6H_5 \cdot NH \cdot NH \cdot C_6H_5 + I_2 = C_6H_5 \cdot N = N \cdot C_6H_5 + 2\,HI\,.$$

Hydrazobenzene itself is electroactive with a moderate depolarising ability. During titration, the measured potential difference thus first slowly rose and then fell sharply under the final depolarising influence of the reagent.

The poor solubility of uric acid was a handicap to the study. Solutions were made in dilute alkali and aliquots diluted with the buffer. The diluted solutions appeared stable since no turbidity developed; they were, however, titrated without delay. The expected stoichiometric ratio is 1:1, corresponding to oxidation to alloxan and urea:

$$C_5H_4O_3N_4 + I_2 + 2\,H_2O = C_4H_2O_4N_2 + CO(NH_2)_2 + 2\,HI\,.$$

The same remarks apply to the oxidation titrations as to those based on substitution, namely that iodine, being a milder agent, is more specific.

Ion Combination. A few titrations have been described for the analysis of large cations by precipitation with iodine/iodide reagent. For example, methylene blue and other basic dyes[9], tetraphenyl arsonium chloride[18] and quaternary ammonium compounds[4,6]. The reaction is probably ion combination, the stoichiometry apparently being in some cases dependent on conditions:

$$R_4N^+ + nI_2 + I' = (R_4N)^+(I_{2n+1})'\,.$$

Except in the last mentioned reference, where potentiometric titration was carried out, the end-points were all visual.

Some titrations have been carried out here of the surface-active material cetyl trimethyl ammonium chloride, using a 0.01 M iodine/iodide reagent As will be seen from Table 3, reaction occurs between 1 mol compound and 1 mol triiodide ion. Titration at p_H 9.2 and 2.9 appeared equally satisfactory. Assuming end-point and equivalence point to be identical, the cetyl trimethylammonium chloride comes out as 97% pure, plausible for technical material.

2. Other Ion Combination Reactions

Two other types have been studied in the present work, namely the titration of cation-active with anion-active detergents (and vice versa); and of some dyes with each other and with picric acid.

Detergents. The analysis of detergents by titration with each other, so that a water-insoluble product is yielded, has been known for some time;

$$Cat^+ + An' = (Cat)^+(An)'$$

e.g., $R_4N^+ \quad RSO_3'$.

End-point determination has generally been visual, using a two-phase system such as chloroform/water and a dye indicator which is liberated or consumed at the end-point, passing into or out of one of the 2 phases[5]; or instrumental, based on surface tension measurements[11], amperometric[14] or photometric (turbidimetric[17]).

Initial work here on polarovoltric end-point determination showed that in the cases studied, the changes in potential difference were small and the end-point difficult to observe. A great improvement was achieved by using Methylene Blue as an 'electro-indicator'. At or very near the equivalence point of the reaction between the detergents, the Methylene Blue is seemingly liberated and it caused a sharp change in the measured potential difference as a result of its depolarising ability. Titrating in either direction gave a similar deflection, so that the titration curve had the form of a peak, similar to a first derivative curve. Methylene Blue has a large cation and combines with large anions such as sulphates and sulphonates of anion-active detergents, being liberated after titration with cation-active materials (this is indeed the principle of many of the visual end-point determinations mentioned above). The peak-type curve suggests that the cation-active detergent may also form some sort of complex with the methylene Blue which inhibits the latter's electroactive property.

The average of some 15 titrations is given in Table 3. Based on the iodometrically measured 97% purity of the cetyl trimethyl ammonium chloride, the purity of the sodium lauryl sulphate is about 88% and that of the cetyl pyridinium chloride, 91%.

Table 3. *Precipitation Titrations*

Compound titrated	Titrant	pH	Concentration (millimols/litre)	Purities Found
Cetyl trimethyl ammonium chloride	iodine	2.9 9.2	0.5 to 2	97% (compound)
Cetyl trimethyl ammonium chloride	sodium lauryl sulphate	2.9	5 to 10	88% (titrant)
Cetyl pyridinium chloride	sodium lauryl sulphate	2.9	5 to 10	91% (compound)
Picric acid	Methylene Blue	2.9	0.5 to 5	94% (titrant)
Naphthol Yellow S	Methylene Blue	2.9	0.5 to 5	98% (titrant)

Variation of the amount of Methylene Blue from about 0.08 to 0.3 ml ~ 0.01 M solution, appeared to be without measurable influence.

Dyes. Reactions of ion or charged particle combination or of complex formation between large molecules of dyes and also certain other large molecules such as picric acid, have hitherto been used as bases for

titration methods mostly with visual end-point such as spotting on filter paper or using a two-phase system and noting the point at which the water-soluble dye disappeared from, or appeared in the water layer[1].

Some titrations with polarovoltric end-point determination have been tried here, of picric acid and the dye Naphthol Yellow S, with Methylene Blue. Dilute acetic acid was found to be the best medium. The colloid stabiliser was used but did not appear wholly necessary.

The problem of the purity of the Methylene Blue proved difficult to solve and a number of products from different sources was tried. Finally a product obtained from the Chroma-Gesellschaft, Stuttgart, was used and some results with it are in Table 3. Taking the picric acid as pure (which was checked by alkali titration), the purity of the Methylene Blue, based on the anhydrous material, was 94%. This agrees reasonably well with the stated 91%.

Based on titration of the Naphthol Yellow S, a purity of 98% was obtained, on the assumption that the reaction takes place between 1 molecule of Naphthol Yellow and 2 of the Methylene Blue. Such stoichiometry has been previously claimed[10] and is plausible, because the Naphthol Yellow molecule has both a $-OH$ and a $-SO_3H$ group and could therefore yield a divalent anion, combining with two Methylene Blue cations.

In conclusion, the authors would like to thank the Deutsche Forschungsgemeinschaft and the Fonds der Chemischen Industrie for financial support enabling the work to be carried out.

References

[1] Baker, P. R. W.: Analyst **79**, 289 (1954); cf. Z. analyt. Chem. **146**, 196 (1955). — [2] Bougault, J.: J. Pharmac. Chim. (6) **7**, 161 (1898). — [3] Čůta, F., and Z. Kučera: Chem. Listy **52**, 595 (1958); cf. Z. analyt. Chem. **166**, 385 (1959). — [4] Dubois, A. S.: Amer. Dyestuff Reporter **34**, 245 (1945). — [5] Epton, S. R.: Trans. Faraday Soc. **44**, 226 (1948). — [6] Hager, O. B., E. M. Young, T. L. Flanagan and H. B. Walker: Analyt. Chemistry **19**, 885 (1949). — [7] Jean, F.: C. R. Acad. Sci. **82**, 982 (1876). — [8] McBride, W. R., and H. W. Kruse: J. Amer. chem. Soc. **79**, 572 (1957). — [9] Pelet, L., and V. Garuti: Bull. Soc. vaudoise Sci. natur. (5) **43**, No. 158, 30 (1907). — [10] Pelet-Jolivet, M.: C. R. Acad. Sci. **145**, 1182 (1907). — [11] Preston, A. M.: J. Soc. Dyers Colourists **61**, 16 (1945). — [12] Rowe, R. A., and L. F. Audrieth: J. Amer. chem. Soc. **78**, 563 (1956). — [13] Siggia, S.: Quantitative Organic Analysis via Functional Groups, Chapman and Hall Ltd., London, p. 75 (1948). — [14] Tanaka, N., and R. Tamamushi: Nature (London) **179**, 311 (1957); cf. Z. analyt. Chem. **158**, 445 (1957). — [15] Treadwell, W. D., and A. Wahl: Helv. chim. Acta **37**, 1948 (1954). — [16] Walisch, W.: Chim. analytique **39**, 63 (1957). — [17] Wickbold, R.: Seifen, Öle, Fette, Wachse **85**, 415 (1959); cf. Z. analyt. Chem. **175**, 204 (1960). — [18] Willard, H. H., and G. M. Smith: Ind. Engng. Chem., anal. Edit. **11**, 186 (1939); cf. Z. analyt. Chem. **130**, 442 (1949/50).

Prof. Dr. M. R. F. Ashworth; Dr. W. Walisch,
Institut f. organ. Chemie d. Universität des Saarlandes, Saarbrücken

Polarographische Bestimmung von Schwefel und schwefelhaltigen Verbindungen in Erdöl und Erdölprodukten sowie von metallischem Abrieb in Altölen

Von
G. R. Schultze und W. Irion[1]

(Referat)

Die Literatur über die polarographische Bestimmung von elementarem Schwefel und Schwefelverbindungen gibt nur ein recht uneinheitliches Bild von der Anwendung auf Erdöl und Erdölprodukte. In systematischen Modellversuchen wird die Möglichkeit einer polarographischen Analyse von elementarem Schwefel, Polysulfiden, Disulfiden, Sulfiden, Mercaptanen und Thiophenen in verschiedenen organischen Lösungsmitteln geprüft.

Die quantitative Bestimmung dieser Stoffe gelingt bei Einhaltung bestimmter experimenteller Bedingungen in Rohölen, Destillationsrückständen, Crack- und Hydrierprodukten. (Extraktion der Öle mit Diäthylamin-Methanol-Wasser oder Piperidin-Methanol-Wasser, Polarographie der wäßrigen Amin-Lösungen.)

Ferner wird eine Methode beschrieben, die die qualitative Erfassung der Disulfide, Sulfide und Mercaptane in Destillaten und chromatographischen Fraktionen von Rohölen, Hydrierprodukten usw. ermöglicht. (Methanol-Benzol-Essigsäure als Lösungsmittel.) Nur die Thiophene lassen kein „Abscheidungspotential" an der Quecksilbertropfelektrode erkennen. Wie die Diskussion zeigt, können hier die von W. Lamprecht, München, gefundenen „Wasserstoffwellen" als Folge der Bildung von Kobalt(II)-Komplexen möglicherweise weiterhelfen. Die Zusammenhänge zwischen Reduktionspotential, Abscheidungsstrom, Lösungsmitteleinfluß und p_H-Wert werden besprochen.

Unabhängig von diesen organisch-polarographischen Methoden wird ein Verfahren mitgeteilt, das die quantitative Bestimmung von Abrieb-Metallen in Motorölen auf anorganisch-polarographischem Wege erlaubt. (Veraschung der Öle, Soda-Salpeter-Aufschluß, Lösung der Schmelzen, Polarographie der Lösungen. Bestimmung von Fe, Pb, Cu, Zn, Ni und Mn nebeneinander möglich.) Dieses Verfahren ist in Zusammenarbeit mit F. Menzinger, Deutsche Gasolin-Nitag A.G. entwickelt worden.

[1] Dissertation W. Irion (Hannover, 1961). — Eine ausführliche Arbeit wird in dieser Z. erscheinen.

Prof. Dr. G. R. Schultze, Hannover, Institut für Erdölforschung

Organisch-Chemisches Institut der Technischen Hochschule und I. Medizinische Klinik der Universität München

Messung und Differenzierung katalytischer Wasserstoffwellen bei der Polarographie von Sulfhydryl- und Disulfidverbindungen

Von
WALTHER LAMPRECHT, SIGMUNDUR GUDBJARNASON
und HUBERT KATZLMEIER

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 14. November 1960)

Metallkationen werden bekanntlich bei der Polarographie durch Messung der Diffusionsströme und der Halbstufenpotentiale einer Analyse zugänglich. Ganz anders liegen die Verhältnisse, wenn man Verbindungen wie Cystin, Eiweißkörper, Alkaloide oder bestimmte Farbstoffe polarographiert. Wie von HEYROVSKÝ, ZUMAN oder BRDIČKA[2,3,9,10] heute noch angenommen wird, sollen solche Stoffe depolarisierend durch Herabsetzung der Wasserstoffüberspannung, d.h. durch Erleichterung der Wasserstoffentwicklung aus der Lösung an der Quecksilbertropfelektrode wirken. Die katalytische Wirkung wird ausschließlich den Sulfhydryl-Gruppen in diesen Verbindungen zugeschrieben.

Der katalytische Effekt tritt allerdings nur dann in Erscheinung, wenn die polarographische Messung in Anwesenheit von Co^{2+}-Ionen durchgeführt wird.

Polarographiert man schwefelhaltige niedrigmolekulare Verbindungen oder Proteine zuerst in ammoniakalisch gepufferter Lösung und dann nach Zusatz von Co^{2+}-Ionen, so ändert sich der Verlauf der Stromspannungskurve grundsätzlich. Der polarographische Kurvenverlauf zeichnet in diesem Fall sogenannte „katalytische Wasserstoffwellen" auf.

Abb. 1 zeigt das Polarogramm einer ammoniakalisch gepufferten Kobaltsalzlösung, die bei allen Messungen als Grundelektrolyt- und Katalysatorlösung diente. Das Maximum bei −1,45 V ist die Kobalt(II)-Reduktionsstufe[17]. Deren Lage kann je nach Zusatz katalytisch wirksamer Substanzen bis −1,3 V verschoben sein, dabei (in den meisten Fällen) stark gesenkt oder (mit wenigen Ausnahmen) erhöht erscheinen.

Wir fanden[8,12], daß man bei der Polarographie katalytisch wirksamer Verbindungen in ammoniakalisch gepufferter Kobaltsalzlösung zwischen 3 charakteristischen Kurvenbildern zu unterscheiden hat, die wir wie folgt definieren:

a) eigentliche „*katalytische Wasserstoffwellen*", b) „*katalytische Wasserstoffstufen*" oder „SN-Stufen" und c) „*katalytische Wasserstoffkurven*" oder sogenannte „S-Anstiege". Jedem charakteristisch ausgeprägtem Kurvenzug ist jeweils eine definierte Molekülgruppierung zugeordnet.

Unsere Ergebnisse stehen auch im Widerspruch zu allen bisher mitgeteilten Theorien über die elektrochemischen Mechanismen bei der Polarographie katalytisch wirksamer Verbindungen, weil grundsätzlich davon ausgegangen wird, die Herabsetzung der Wasserstoffionen-Reduktion in ammoniakalisch gepufferter Kobaltsalzlösung sei ausnahmslos an Sulfhydryl- oder NH_2-Gruppen gebunden.

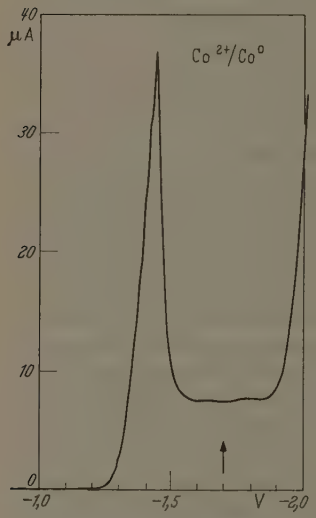


Abb. 1. Co^{2+}/Co^{0}-Reduktionsstufe. Polarogramm der Grundelektrolytlösung

Methodik

Die Messungen wurden mit einem automatisch registrierenden Polarographen der Fa. Radiometer, Kopenhagen, Modell PO 4, durchgeführt*.

Lösungen. *1 m Puffer, p_H 9,85.* Zu 17,81 g NH_4Cl, gelöst in Wasser, werden 47,2 ml 25%iges Ammoniak gegeben und auf 1 l aufgefüllt (p_H-Kontrolle mit Glaselektrode). *0,048 m Kobaltsalzlösung.* 1,14 g $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ in 100 ml Wasser (die Endmolarität an $CoCl_2$ in der Elektrolytlösung beträgt $9{,}6 \cdot 10^{-4}$ m).

Meßvorgang. In das Elektrodengefäß (18 bis 20 ml Volumen) werden (14,7 — x) ml Puffer pipettiert und etwa 5 min mit reinem, sauerstofffreiem Stickstoff begast. Dabei wird im Eisbad auf 1—2° C abgekühlt. Dann gibt man 0,3 ml Kobaltsalzlösung zu, hierauf x ml Probelösung (0,01—0,75 ml); mit Stickstoff wird während des gesamten Meßvorganges begast, dabei die Lösungen gut vermischt. — *Startpunkt.* Für alle Messungen —0,9 V.

Einstellung des Gerätes *(Radiometer, Modell PO 4).* Für sämtliche Messungen gleichbleibend; spezielle Änderungen in der Sensitivity sind in der Abbildungsunterschrift besonders vermerkt.

Current Sensitivity: 50 μA über die Skalenbreiten von 10—100 Skaleneinheiten (22,5 cm auf dem Registrierstreifen). — Damping: Stufe 7.

Condensor current und Diffusion current (grob und fein): sämtliche Nullstellung; Gesamtkompensation = 0.

$A = 0{,}1$ V/cm; $B = 4$ cm/min; $AB = 0{,}4$ V/min.

Höhe des Quecksilberniveaus: 50,0 cm.

Glascapillare: Etwa 0,05 mm; Tropfgeschwindigkeit etwa 1 Tr./3 sec.

* Lieferfirma: Kurt Hillerkus, Krefeld, Uerdinger Straße 463.

Ergebnisse

Katalytische Wasserstoffwellen

Cystein, der einfachste Vertreter einer SH-Aminosäure, zeigt bei der polarographischen Messung die bekannte katalytische Wasserstoffwelle („Brdička-Reaktion"). Die Lage dieser Welle ist nach unseren Messungen allerdings konzentrationsabhängig mit Maxima zwischen −1,75 und −1,80 V (Kurven *1a* und *1b*, Abb. 2).

Cystin liefert eine dem Cystein identische katalytische Welle (Kurve *2*, Abb. 2). Beim Potential −1,7 V ist nach HEYROVSKÝ[10] bereits das gesamte Cystin an der Oberfläche der Tropfelektrode reduziert, so daß ab −1,7 V eigentlich nur Cystein katalytisch wirksam wird.

Reduziertes Glutathion („SH-Glutathion") hat nach Angaben der Literatur[5] eine dem Cystein analoge katalytische Wasserstoffwelle bei −1,8 V. Wir können dies nicht bestätigen. Wie später gezeigt wird, liefert SH-Glutathion eine „katalytische Wasserstoffkurve", einen Effekt auf die Herabsetzung der Wasserstoffionen-Reduktion, der verschieden von dem des Cysteins oder Cystins ist.

Dagegen zeigt oxydiertes Glutathion („S—S-Glutathion") wieder das Bild einer typischen Wasserstoffwelle bei −1,7 V (Kurve *3*, Abb. 2). Dabei ist zu betonen, daß S—S-Glutathion im Vergleich zu Cystin noch in etwa 100fach molarem Überschuß bedeutend weniger katalytisch wirksam ist. Von Interesse war das Verhalten einiger Derivate des Cysteins: Penicillamin hat die gleichen katalytischen Eigenschaften wie Cystein selbst (Kurve *4*, Abb. 2), der katalytische Effekt verliert sich nach Benzylierung der SH-Gruppe; S-Benzyl-cystein[16] oder S-Benzyl-penicillamin sind katalytisch wirkungslos (Kurve *5*, Abb. 2). Cystinylglycin weist nur mehr ein schwaches Maximum bei −1,80 V auf (Kurve *6*, Abb. 2).

Thioglykolsäure und Dithiodiglykolsäure zeigen ausgeprägte katalytische Wellen mit Maxima bei −1,83 V (Kurven *7* und *8*, Abb. 2). Der polarographische Kurvenverlauf entspricht aber nicht dem von Cystein, da das Maximum weniger stark ausgeprägt erscheint. In diesem Sinne bilden Thiomilchsäure (Kurve *9*, Abb. 2) und Dithiomilchsäure (Kurve *10*, Abb. 2) ausgeprägte Maxima bei −1,80 bzw. −1,83 V. Thioäpfelsäure hat ebenfalls eine starke und charakteristische katalytische Welle, abhängig von der Konzentration in der Meßlösung zwischen −1,76 und −1,79 V (Kurve *11*, Abb. 2). Das Maximum der Thioäpfelsäurewelle ist im Vergleich zur Cysteinwelle deshalb ausgeprägter, weil das Minimum bei −1,91 V bzw. −1,93 V sehr tief zu liegen kommt. Die katalytische Welle von Disulfidbernsteinsäure erscheint bei −1,82 V (Kurve *12*, Abb. 2) der Ester von Thioglykolsäure ist dagegen katalytisch wirkungslos (Kurve *13*, Abb. 2).

Während aliphatische Aldehyde und Ketone (wie Formaldehyd, Acetaldehyd oder Aceton) keine katalytische Wirksamkeit haben,

liefern Hydroxyaldehyde oder Hydroxyketone typische katalytische Wasserstoffwellen. Als Beispiele werden Glycerinaldehyd und Dihydroxy-

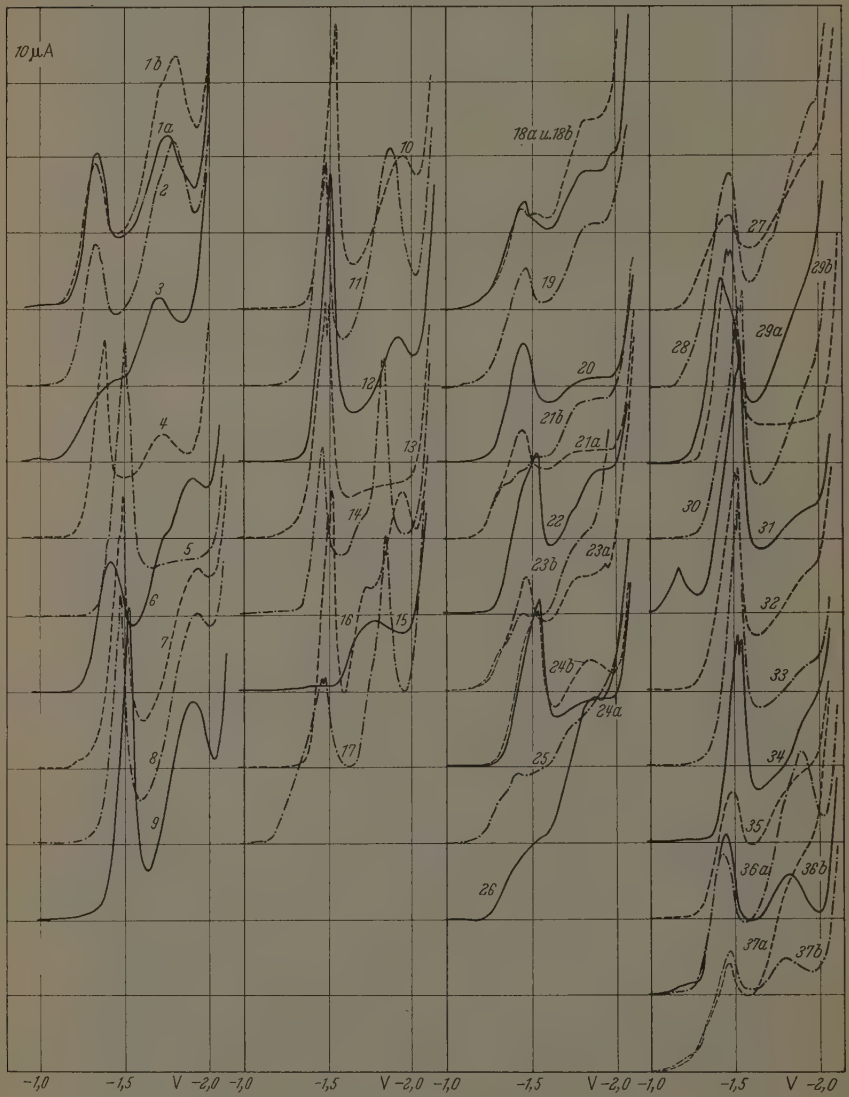


Abb. 2

aceton gezeigt. Daß die Glycerinaldehydwelle bei −1,72 V keine Reduktionsstufe[17] darstellt, zeigt die polarographische Messung des Aldehydes ohne Co^{2+}-Zusatz (Kurven *14* und *15*, Abb. 2). Die katalytische Welle des Aldehyds ist schmaler und spitzer als die Cysteinwelle, das folgende Minimum liegt tiefer. Dihydroxyaceton hat eine gutausgebildete Welle bei −1,85 V (Kurve *16*, Abb. 2).

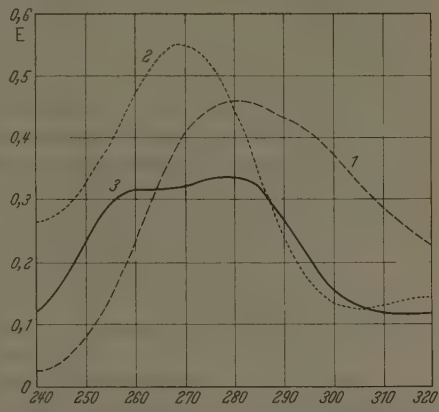


Abb. 3. UV-Spektrogramm von 2,4-Dimercaptopyrimidin. Kurve *1*: $2 \cdot 10^{-5}$ m Lösung in 0,1 n Salzsäure. Kurve *2*: $2 \cdot 10^{-5}$ m Lösung in 0,1 n Natronlauge. Kurve *3*: $2 \cdot 10^{-5}$ m Lösung in NH_4OH/NH_4Cl-Puffer + Co^{2+}-Ionen (Grundelektrolytlösung) vom p_H 9,85

Wir nehmen deshalb an, daß im Glycerinaldehyd neben den Hydroxylgruppen die Carbonylgruppe zur Auslösung des katalytischen Effektes verantwortlich zu machen ist; so ist Glycerinsäure katalytisch wirkungslos. Für diese Annahme sprechen ferner die Ergebnisse mit 2,4-Dimercaptopyrimidin. Die Verbindung zeigt, ähnlich wie Glycerinaldehyd, bei −1,74 V eine spitze katalytische Welle (Kurve *17*, Abb. 2). In diesem Fall wäre, neben den N-Atomen des Pyrimidins, der Thionylgruppe die katalytische Wirksamkeit zuzuschreiben. Daß beim p_H der Meßlösung (9,85) tatsächlich das 2,4-Dimercaptopyrimidin noch teilweise als Thioketon vorliegt, beweisen spektrophotometrische Messungen. In 0,1 n

Abb. 2. Katalytische Wasserstoffwellen (Kurven *1*—*17*), katalytische Wasserstoffstufen (Kurven *18*—*24*) und katalytische Wasserstoffkurven (Kurven *25*—*37*). *1a* 0,1 μMol Cystein. *1b* 0,2 μMol Cystein. *2* 0,1 μMol Cystin. *3* 10 μMol oxydiertes Glutathion. *4* 0,1 μMol Penicillamin. *5* 1 μMol S-Benzyl-penicillamin. *6* 0,1 μMol Cystinylglycin. *7* 0,1 μMol Thioglykolsäure. *8* 0,2 μMol Dithiodiglykolsäure. *9* 0,5 μMol Thiomilchsäure. *10* 0,37 μMol Dithiomilchsäure. *11* 0,5 μMol Thioäpfelsäure. *12* 0,5 μMol Disulfidbernsteinsäure. *13* 1 μMol Thioglykolsäureäthylester. *14* 20 μMol DL-Glycerinaldehyd. *15* 20 μMol DL-Glycerinaldehyd ohne Co^{2+}-Zusatz bei p_H 9,85. *16* 25 μMol Dihydroxyaceton. *17* 5 μMol 2,4-Dimercaptopyrimidin. *18a* 75 μMol Cysteamin 5 min nach Zugabe und Messung i. d. Grundelektrolytlösung. *18b* 75 μMol Cysteamin 15 min nach Zugabe und Messung i. d. Grundelektrolytlösung. *19* 30 μMol N-Acetylcysteamin. *20* 50 μMol N,S-Diacetylcysteamin. *21a* 1 mg Coenzym A. *21b* 3 mg Coenzym A. *22* 0,3 μMol Cysteinylglycin. *23a* 50 μMol S-Acetylglutathion, gemessen sofort nach Zugabe zur Grundelektrolytlösung. *23b* 50 μMol S-Acetylglutathion, gemessen 30 min nach Zugabe zur Grundelektrolytlösung. *24a* 0,1 μMol Cystindimethylester, gemessen sofort nach Zugabe zur Grundelektrolytlösung. *24b* 0,1 μMol Cystindimethylester, gemessen 45 min nach Zugabe zur Grundelektrolytlösung. *25* 10 μMol reduziertes Glutathion. *26* 2,5 μMol reduziertes Glutathion + 10 μMol oxydiertes Glutathion. *27* 3 μMol Thioglykol. *28* 2 μMol 2,3-Dimercaptopropanol („BAL"). *29a* 0,2 μMol reduzierte α-Liponsäure. *29b* 0,2 μMol oxydierte α-Liponsäure *30* 50 μMol Äthylmercaptan. *31* Etwa 20 μMol Diäthyldisulfid. *32* 10 μMol β-Thiopropionsäure. *33* 3 μMol Dithiodihydracrylsäure. *34* 0,5 μMol Cystamintetraessigsäure. *35* 3 μMol Thiazolin (unsubstituiert). *36a* 0,2 μMol Cystein. *36b* 0,2 μMol Cystein + 4 μMol p-Chlormercuribenzoat (PCMB). *37a* 5 μMol reduziertes Glutathion. *37b* 5 μMol reduziertes Glutathion + 7 μMol p-Chlormercuribenzoat (PCMB)

Natronlauge besitzt 2,4-Dimercaptopyridin ein Extinktionsmaximum bei 268 nm, in 0,1 n Salzsäure dagegen bei 280 nm. Das UV-Spektrum der gleichen Substanzmenge im (bei der Polarographie) verwendeten NH_3/NH_4Cl-Puffer (p_H 9,85) zeigt ein Doppelmaximum (Abb. 3). Dieser Versuch zeigt zugleich, daß die Messung katalytischer Wasserstoffwellen eine brauchbare Methode zum Studium von Keto-Enol-Gleichgewichten sein kann.

Keine katalytischen Effekte auf die Wasserstoffionen-Reduktion haben — neben den bereits erwähnten aliphatischen Aldehyden, Ketonen oder Schiffschen Basen — alle bisher von uns vermessenen aliphatischen Fettsäuren, α- und β-Hydroxyfettsäuren oder Ketosäuren (wie Äpfelsäure, Weinsäure, Brenztraubensäure, Hydroxybrenztraubensäure, Milchsäure und andere), ebenso Thioester mit der Gruppierung $-\overset{\overset{S}{\|}}{C}-OC_2H_5$.

Katalytische Wasserstoffstufen

Bei der polarographischen Vermessung von Thioäthanolamin wäre, nach den heutigen Vorstellungen über die Funktion katalytisch wirksamer Verbindungen an der Quecksilbertropfelektrode, das Auftreten einer katalytischen Wasserstoffwelle zu erwarten. Analog dem Verhalten von Cystein sollte, nach der Theorie von Brdička[4], Heyrovský[10] oder Jensch[11] eben durch diese SH- und NH_2-Gruppen der gleiche Effekt ausgelöst werden. Entgegen dieser Annahme haben wir festgestellt, daß Thioäthanolamine und analoge Verbindungen nicht in der Lage sind, auf die Herabsetzung der Wasserstoffionen-Reduktionen wie Cystein zu wirken.

Abhängig von ihrer Konstitution tritt bei dieser Verbindungsklasse ein typisches und bisher nie beschriebenes polarographisches Kurvenbild in Erscheinung, das die Form einer Stufe besitzt. In Anlehnung an den Begriff „katalytische Wasserstoffwelle" nennen wir diese Kurvenbilder „katalytische Wasserstoffstufen" oder „katalytische SN-Stufen" (aus Gründen, die in der Diskussion dargelegt werden).

Cysteamin selbst (Thioäthanolamin) hat eine relativ geringe, wenn überhaupt katalytische Wirksamkeit auf die Wasserstoffüberspannung. Im Polarogramm erscheint aber die erwähnte und die für diesen Verbindungstyp charakteristische „katalytische Wasserstoffstufe" bei −1,7 V (Kurve *18a*, Abb. 2). Während des Meßvorganges färbt sich trotz Abwesenheit von Sauerstoff die Lösung mit der Zeit rotbraun [Kobalt(II)-amminkomplex], mit der Vertiefung der Farbe steigt gleichzeitig die Höhe der katalytischen Stufe an (Kurve *18b*, Abb. 2).

Auch N-Acetylcysteamin und N,S-Diacetylcysteamin liefern charakteristische katalytische Wasserstoffstufen bei −1,7 V (Kurven *19* und *20*, Abb. 2). Ihre Höhe ist — ebenso wie bei Cysteamin — konzentrationsabhängig und abhängig von der Farbtiefe der Lösung; auch die ace-

tylierten Derivate des Cysteamin verfärben sich beim Stehen ihrer Lösung in Kobalt(II)-ammoniakpuffer mit der Zeit.

Reine Coenzym A-Präparate zeigen wie Cysteamin katalytische Wasserstoffstufen bei −1,65 V (Kurven *21a* und *b*, Abb. 2), deren Höhe wird mit der Zeit aber nicht verändert.

Während Cysteinylglycin analog dem Cysteamin eine katalytische Stufe liefert, (Kurve *22*, Abb. 2) ist S-Benzylcysteinylglycin katalytisch wirkungslos.

S-Acetylglutathion ist katalytisch wirksam und liefert eine katalytische Stufe bei −1,7 V; infolge alkalischer Hydrolyse bildet sich nach einiger Zeit der für SH-Glutathion typische Kurvenverlauf aus (Kurve *23a* und *b*, Abb. 2).

Cystindimethylester zeigt ebenfalls bei der polarographischen Messung das Bild einer katalytischen Wasserstoffstufe (Kurve *24a*, Abb. 2); nach längerem Stehen in der ammoniakalischen Lösung erscheint, mit der Geschwindigkeit der Esterhydrolyse, die katalytische Wasserstoffwelle von Cystin (Kurve *24b*, Abb. 2).

Katalytische Wasserstoffkurven

Nach den Angaben der Literatur[5] soll reduziertes Glutathion („SH-Glutathion") bei der polarographischen Messung in Co^{2+}/Ammoniakpuffer eine dem Cystein gleiche katalytische Wasserstoffwelle aufweisen. Mit Präparaten verschiedensten Reinheitsgrades und verschiedenster Herkunft konnten wir nie das Auftreten derartig beschriebener „Cysteinwellen" am Tripeptid sehen. SH-Glutathion ist wohl katalytisch wirksam, der Effekt auf die Herabsetzung der Wasserstoffionen-Reduktion ist aber verschieden von dem des Cysteins oder Cystins.

Reduziertes Glutathion liefert im Polarogramm ein Kurvenbild, welches man „steiler konvexer Kurvenanstieg" nennen könnte. Der katalytische Effekt setzt beim Potential −1,5 V ein (Kurve *25*, Abb. 2). Form und Höhe des „Kurvenanstieges" (μA-Zahl) ist charakteristisch für SH-Glutathion, ist aber, wie nachfolgend gezeigt, nicht nur auf das Tripeptid beschränkt. Wird die jeweilige Konzentration an SH-Glutathion gegen die Kurvenhöhe bei −1,70 V aufgetragen, so erhält man eine Eichkurve zur Konzentrationsbestimmung[7].

Hiermit liegt also eine Verbindungsklasse vor, welche weder wie Cystein oder Cystin katalytische Wasserstoffwellen, noch wie Thioäthanolamine katalytische Wasserstoffstufen liefert. Da dieser Effekt auf die Wasserstoffionen-Reduktion unseres Wissens nicht beschrieben ist, nennen wir solche polarographischen Kurvenbilder, wie sie dem SH-Glutathion entsprechen, und welche in ihrer Form sogenannte „steile konvexe Kurvenanstiege" darstellen, „katalytische Wasserstoffkurven" oder „S-Anstiege" (vgl. Diskussion).

Ein Gemisch von SH- und —S—S-Glutathion im molaren Verhältnis 1:4 liefert ein zusammengesetztes Kurvenbild der entsprechenden Wellenhöhe von S—S-Glutathion und Kurvenhöhe von SH-Glutathion (Kurve *26*, Abb. 2). Oxydiertes Glutathion ist also unter den Versuchsbedingungen der Messung stabil. Würde nämlich die —S—S-Brücke des Glutathion aufgespalten, so müßte statt der auftretenden Welle ausschließlich der steile Kurvenanstieg des SH-Glutathions erscheinen.

Thioglykol und Dithioglykol liefern polarographische Kurvenbilder, welche vollkommen dem Kurvenverlauf von SH-Glutathion entsprechen (Kurve *27*, Abb. 2). Der Effekt, der zum Anstieg der katalytischen Wasserstoffkurve führt, setzt ebenfalls bei —1,5 V ein.

Obwohl das Molekül des 2,3-Dimercaptopropanol (BAL) 2 freie Sulfhydrylgruppen besitzt, zeigt es keine katalytische „Cysteinwelle", sondern eine katalytische Wasserstoffkurve bei —1,5 V (Kurve *28*, Abb. 2).

Reduzierte α-Liponsäure (Kurve *29a*, Abb. 2) hat die katalytische Wirksamkeit wie Thioglykol. Nach der Oxydation mit Jod zeigt die Disulfidform überhaupt keinen katalytischen Effekt mehr (Kurve *29b*, Abb. 2).

Äthylmercaptan und Diäthyldisulfid besitzen ebenfalls charakteristische Wasserstoffkurven (Kurven *30* und *31*, Abb. 2). Wegen der Schwerlöslichkeit des Disulfides können keine exakten Konzentrationsangaben gemacht werden.

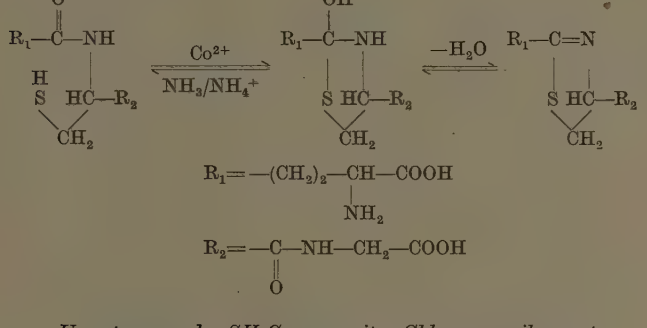
β-Thiopropionsäure und Dithiodihydracrylsäure liefern keine katalytischen Wellen, sondern katalytische Wasserstoffkurven (Kurven *32* und *33*, Abb. 2). Auch Cystamintetraessigsäure zeigt den konvexen Kurvenanstieg (Kurve *34*, Abb. 2).

Die Frage, weshalb SH-Glutathion keine dem Cystein entsprechende katalytische Welle liefert, kann durch folgende Untersuchungsergebnisse befriedigend erklärt werden. Es wäre zu erwarten gewesen, daß dem Tripeptid ein dem Cysteinylglycin (Kurve *22*, Abb. 2) ähnlicher Kurvenverlauf zukommt. Nach dem Auftreten des beschriebenen, davon aber gänzlich andersartigen Kurvenbildes haben wir das Verhalten von SH-Glutathion in der ammoniakalischen Kobaltsalzlösung untersucht. Wir fanden, daß das UV-Spektrum von SH-Glutathion in Co^{II}-Ammoniak-Puffer (p_H 9,85) praktisch identisch ist mit dem von Thiazolin, wenn dieses unter den gleichen Bedingungen gemessen wird (Glutathion λ_{max} = 288 nm, Thiazolin λ_{max} = 285 nm). Dieser Befund stimmt mit dem polarographischen Ergebnis überein, wonach Thiazolin den gleichen Kurvenverlauf wie SH-Glutathion liefert (Kurve *35*, Abb. 2).

SH-Glutathion gibt in Ammoniakpuffer (p_H 9,85) mit Nitroprussidnatrium die bekannte und relativ beständige Violettfärbung, jedoch nur dann, wenn keine Co^{2+}-Ionen enthalten sind. Ein Co^{2+}-Ionenzusatz zu

dieser Farblösung läßt die Violettfärbung momentan verschwinden. Thiazolin gibt mit Natriumnitroprussiat in Ammoniak- und in Co^{II}-Ammoniakpuffer (p_H 9,85) die gleiche und schnell wieder verschwindende rotviolette Farbreaktion.

Aus diesen Ergebnissen schließen wir, daß SH-Glutathion in Ammoniakpuffer (p_H 9,85) bei Anwesenheit von Co^{2+} einen intramolekularen Ringschluß unter Ausbildung des Thiazolinringes nach H_2O-Abspaltung erleidet, eine analoge Reaktion, die vom Tripeptid in saurer Lösung bekannt ist[6]:



Umsetzungen der SH-Gruppe mit p-Chlormercuribenzoat

p-Chlormercuribenzoat (PCMB) ist nach Boyer[1] ein spezifisches Reagens zur quantitativen spektrophotometrischen Bestimmung freier Sulfhydrylgruppen, da die UV-Absorption dieses Reagenses zwischen 230 und 280 nm in Gegenwart von SH-Gruppen stark anwächst[18]:

$$R-SH + ClHgC_6H_4COOH \rightarrow R-S-Hg-C_6H_4COOH + H^+ + Cl^-.$$

Nach Zugabe von PCMB zu *Cystein* sinkt die katalytische Wasserstoffwelle der Aminosäure bei $-1{,}80$ V momentan ab, zugleich erscheint eine neue, mehr ins Positive verschobene Welle bei $-1{,}72$ V (Kurven *36a* und *b*, Abb. 2).

Die Höhe dieser Welle verändert sich auch bei großem PCMB-Überschuß nicht mit der Zeit.

p-Chlormercuribenzoat selbst hat in Kobaltsalzlösung *keinen* Einfluß auf die Wasserstoffionen-Reduktion, es erscheint ausschließlich die Kobalt-Reduktionsstufe.

Bei der Umsetzung von *SH-Glutathion* mit PCMB wird deutlich, daß die bei der Reaktion mit Cystein entstehende (neue) katalytische Welle tatsächlich der S-Hg-Bindung zugeordnet ist: der konvexe Anstieg der katalytischen Wasserstoffkurve des SH-Glutathion verschwindet nach PCMB-Zusatz völlig, bei $-1{,}7$ V tritt dafür wie beim Cystein eine Welle,

unberücksichtigt bleiben darf. Nach Brdička[2,3,9,10] kann eine S—S-Gruppe auf die Wasserstoffüberspannung erst dann wirksam werden, wenn die bei positiveren Potentialen erfolgende Reduktion zu Sulfhydrylgruppen vorangegangen ist. Wenn diese Annahme richtig ist, wäre eben der Kurvenverlauf von SH-Glutathion (steiler Anstieg der Strom-Spannungs-Kurve) zu erwarten.

Wenn man nun die stereochemischen Verhältnisse bei Glutathion betrachtet, kommt man zu folgenden Feststellungen: In einem offenkettigen Disulfid erwartet man freie Drehbarkeit um die Achse der S—S-Bindung. Wärmekapazitätsmessungen an Dimethyldisulfid und Diäthyldisulfid deuten auf eine Behinderung der freien Drehbarkeit zur coplanaren Stellung mit einer Energieschwelle von 10—15 kcal[14,15] (Winkel zwischen den C—S-Bindungen = 180°).

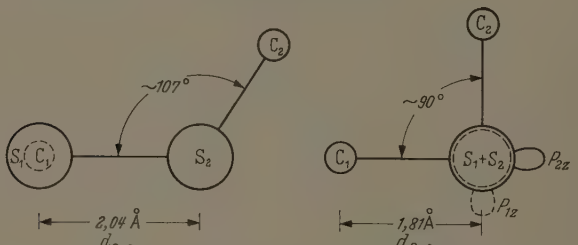


Abb. 4. Geometrie des C—S—S—C-Systems nach [19]. C_1 bzw. C_2 = Kohlenstoffatome, S_1 bzw. S_2 Schwefelatome, P_{1z} bzw. P_{2z} Orbitals der Schwefelatome

Die Geometrie eines C—S—S—C-Systems weicht davon ab, sie ist in Abb. 4 dargestellt. Einer der möglichen Gründe für die Behinderung der freien Drehbarkeit der S—S-Bindung ist ein Überlappen der P_z-Orbitals der beiden Schwefelatome. Die stabile Konfiguration ist dann das Disulfid mit einem Winkel von 90° zwischen den C—S-Bindungen[19]. Versucht man, auf Grund der in Abb. 4 angegebenen Daten die räumliche Struktur von oxydiertem Glutathion zu zeichnen, so ergibt sich, als eine der möglichen Formen, die in Abb. 5 dargestellte Geometrie: Das eine Glutathionmolekül liegt in der Papierebene, das zweite senkrecht dazu. Damit wird die unmittelbare Nachbarschaft einer Carboxylgruppe an eine Disulfidgruppe möglich. Die katalytische Wirksamkeit von SS-Glutathion kann somit — wie in allen gezeigten Beispielen von Disulfiden — durch Komplexbildung des Co^{2+} mit S—S- und COOH-Gruppen erklärt werden.

Das verschiedene Verhalten von SH- und S—S-Glutathion bei der Polarographie deutet darauf hin, daß die elektrochemischen Vorgänge an der Tropfelektrode, insbesondere in bezug auf die bei der Wasserstoff-

abscheidung auftretenden Ströme, bei der reduzierten und der der oxydierten Form unterschiedlicher Natur sein müssen. Die Ansicht BRDIČKAS[4] und HEYROVSKÝS[10], wonach das gesamte Cystein beim Potential −1,7 V an der Oberfläche der Tropfelektrode bereits reduziert sein soll, wodurch eigentlich nur Cystein katalytisch wirksam wird, kann zumindest nicht auf das oxydierte Glutathion zutreffen. In diesem Falle müßte nämlich SH- und S—S-Glutathion den gleichen polarographischen Kurvenverlauf aufweisen. Wenn man dagegen von unserer Ansicht ausgeht, nur Kobaltkomplexe oder Innerkomplexe mit Co^{2+} seien die eigentlichen Katalysatoren, sowie ferner die beschriebenen Reaktionsmöglichkeiten von SH- einerseits und S—S-Glutathion andererseits berücksichtigt, so erübrigt sich natürlich die Frage in der Diskussion, ob zur Auslösung der katalytischen Wirksamkeit erst die Disulfidbrücke geöffnet werden muß. Die gleichen Verhältnisse wie bei oxydiertem Glutathion werden bei Cystinylglycin vorliegen. Die katalytische Wasserstoffwelle des Cystinylglycins kann nur durch unmittelbare Nachbarschaft von S—S- und COOH-Gruppen zustande kommen. Für das Molekül läßt sich ein gleiches Raummodell aufstellen, wie es für SS-Glutathion gefordert wird. Die Komplexbildung des Co^{2+} mit SS- und COOH-Gruppen scheint gegenüber der mit NH_2- und SS-Gruppen bevorzugt zu sein, sonst müßte im Polarogramm eine katalytische Wasserstoffstufe erscheinen (vgl. auch Cystin).

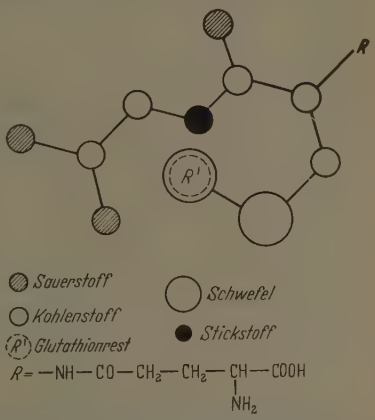


Abb. 5. Raummodell von oxydiertem Glutathion; das eine Molekül des Glutathions liegt in der Papierebene, das andere steht senkrecht dazu mit ®'

Bei Cysteinylglycin ist dagegen eine Nachbarschaft zwischen SH- und COOH-Gruppen nicht möglich, die Verbindung zeigt in der Strom-Spannungskurve das Bild einer katalytischen Wasserstoffstufe, so daß man annehmen muß, Co^{2+} errichtet zu NH_2- und SH-Gruppen Valenzen.

SH-Glutathion sollte wie Cysteinylglycin eine katalytische Wasserstoffstufe liefern. Wie wir aber zeigen konnten, reagiert das Tripeptid unter den gegebenen Versuchsbedingungen zum Thiazolinderivat. Damit ist für Co^{2+} die Möglichkeit verschlossen, mit dem Molekül Innerkomplexe auszubilden, so daß SH-Glutathion katalytisch wie eine „reine" SH- oder SS-Verbindung mit dem typischen konvexen Anstieg, der katalytischen Wasserstoffkurve, reagiert. Dieser Befund steht übrigens

Organisch-chemisches Institut der Technischen Hochschule und I. Medizinische Klinik der Universität München

Polarographie schwefelhaltiger Proteine

Von

WALTHER LAMPRECHT und HUBERT KATZLMEIER*

Mit 20 Textabbildungen

(Eingegangen am 5. Dezember 1960)

Bei der Polarographie von Proteinen in ammoniakalisch gepufferter Kobalt(II)-salzlösung ist die sogenannte „Serum-Reaktion" nach BRDIČKA[2] die bekannteste. Vor einigen Jahren hat man sogar versucht, mit Hilfe dieser Reaktion Veränderungen im Plasma von Krebskranken festzustellen.

Verschiedene Proteine geben in der gepufferten Kobalt(II)-salzlösung im polarographischen Kurvenbild sogenannte „Doppelstufen". Selbst in Abwesenheit von Kobalt bildet sich in der Lösung eines Proteins die sogenannte „Pränatriumstufe" aus, das ist die Stufe, welche im positiveren Potentialbereich liegt. In den meisten Fällen wurde gerade diese Welle zur Charakterisierung der Proteine und vor allem der pathologischen Situationen herangezogen.

Wir haben jedoch gefunden, daß diese erste Eiweißwelle verschwindet, wenn die polarographische Messung bei 0° C (Eiswasser) durchgeführt wird[4]. Unter diesen Bedingungen erscheint nur die *zweite* katalytische Eiweißwelle der sogenannten „Doppelstufe" (vgl. Abb. 1).

Zur Messung katalytischer Wasserstoffwellen wurde die Methode von LAMPRECHT u. GUDBJARNASON[5] angewendet; auch Meßanordnung und Pufferlösung wurden unverändert beibehalten**.

Ergebnisse

1. Disulfid-Proteine („SS-Proteine")

„Disulfid-Proteine", bei denen man das Vorhandensein von Disulfidgruppen bereits auf anderem Wege nachgewiesen hat, zeigen ausnahmslos das Polarogramm einer sehr ausgeprägten katalytischen Wasserstoffwelle im Bereich von — 1,55 bis — 1,70 V. Die Co^{2+}-Reduktionsstufe ist

* Auszug aus der Dissertationsschrift H. KATZLMEIER, Technische Hochschule München (1959).

** In allen Abbildungen entsprechen auf der Ordinate 10—100 Skaleneinheiten = 50 μA (22,5 cm auf dem Registrierstreifen); Gerät: Radiometer, Modell PO 4 (Lieferfirma: Kurt Hillerkus, Krefeld, Uerdinger Straße 463).

dabei vollständig verschwunden; die Höhe der katalytischen Welle ist konzentrationsabhängig, die Kurvenform ändert sich mit der Zeit nicht.

Nach unseren Messungen enthalten folgende Proteine bzw. Enzyme katalytisch wirksame SS-Gruppen: Aldolase, Phosphoglyceratkinase, Glycerophosphatdehydrogenase, Peroxydase, Trypsin, Chymotrypsin (Abb. 2), Casein (Abb. 3), Eieralbumin (Abb. 4), Papain und Pepsin.

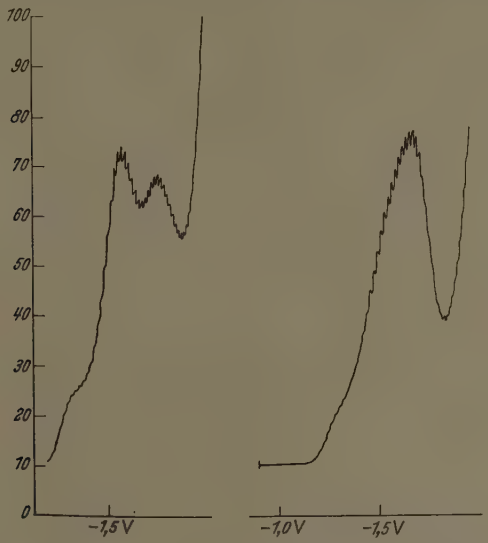


Abb. 1. 1 mg Phosphoglycerinaldehyd-dehydrogenase, linke Kurve gemessen bei 20° C, rechte Kurve bei 0° C

2. Sulfhydryl-Proteine („SH-Proteine")

Typische „SH-Proteine" weisen überhaupt keine katalytischen Wasserstoffwellen auf. Lediglich die Co^{2+}-Reduktionsstufe wird bei Messung dieser Proteine verschoben und etwa auf die Hälfte ihrer ursprünglichen Höhe deformiert.

Bei längerem Stehen in der Pufferlösung (30—150 min) bilden sich mit SH-Proteinen neuen katalytische Wellen aus, deren Maximum zwischen —1,65 und — 1,7 V liegt. Gleichzeitig erniedrigt sich die Co^{2+}-Reduktionsstufe.

Als „reine SH-Enzyme" wurden von uns folgende Enzyme vermessen: Milchsäuredehydrogenase, Leber-Alkoholdehydrogenase (Abb. 5 und 6), Glutaminsäuredehydrogenase, Katalase und Pyruvatkinase (Abb. 7).

Wir führen die Entstehung dieser Welle einmal auf die Oxydation von SH- und SS-Gruppen durch Sauerstoffspuren und zum anderen auf

hydrolytische Abspaltung von Cystein oder Cystin zurück, da beide Vorgänge die neue katalytische Welle hervorrufen können.

Gibt man das SH-Gruppen-Reagens p-Chlormercuribenzoat (PCMB) zu, so erfolgt mehr oder weniger schnell die Bildung einer katalytischen Welle von — 1,6 bis —1,7 V (Abb. 7 und 8).

3. Gemischte Sulfhydryl-/Disulfid-Proteine

Gemischte SH/SS-Proteine zeigen im Polarogramm eine katalytische Welle, deren Maximum zwischen —1,55 und 1,70 V liegt.

Die Höhe der Welle ist konzentrationsabhängig; außerdem steigt sie im Unterschied zu „reinen" SS-Proteinen mit der Zeit an. Die katalyti-

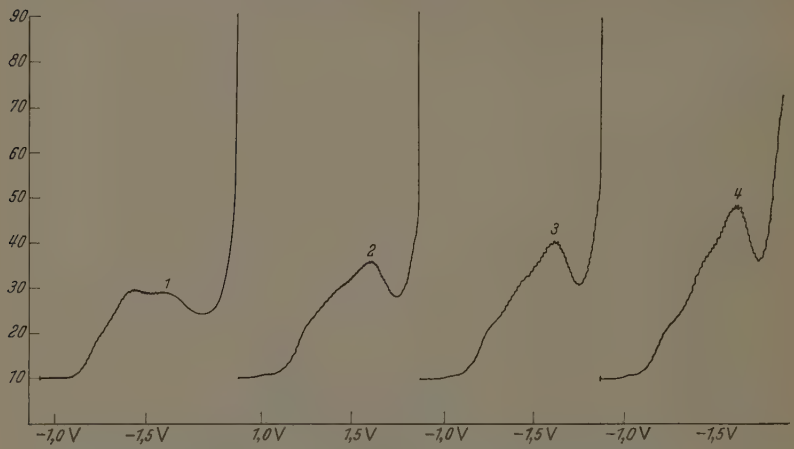


Abb. 8. 1,0 mg Lactatdehydrogenase; Kurve *1* Polarogramm des Enzymes; Kurve *2* + 0,1 ml PCMB-Lösung $2 \cdot 10^{-2}$ m nach 15 min; Kurve *3* wie Kurve *2* jedoch nach 30 min; Kurve *4* wie Kurve *2* und *3* jedoch nach 130 min

schen Wellen werden durch PCMB-Zusatz stark erhöht. Auch hier ist der Anstieg des Maximums von der Natur des Proteins abhängig. Die Co^{2+}-Reduktionsstufe schließlich ist bei allen SH/SS-Proteinen vollständig unterdrückt.

Nach unseren Ergebnissen sind „gemische SH- und SS-Proteine": Phosphoglycerinaldehyddehydrogenase, Hefe-Alkoholdehydrogenase, Glucose-6-phosphatdehydrogenase (Zwischenferment) (Abb. 9) und Enolase (Abb. 10 und 11).

4. Schwefelfreie Proteine

Als schwefelfreie Proteine standen uns Protamine zur Verfügung: Salmin (Abb. 12), Clupein (Abb. 13) und Iridin.

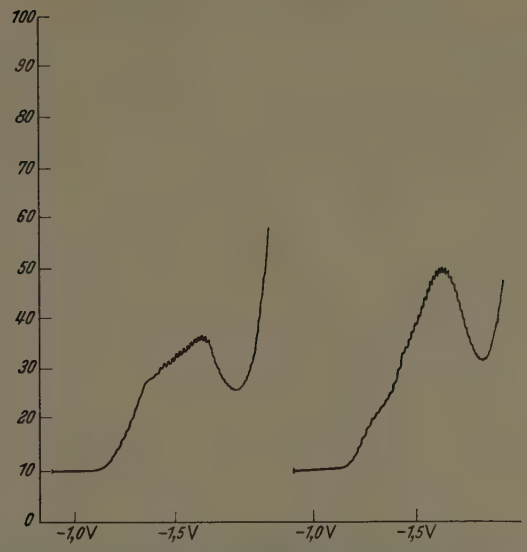


Abb. 9. Polarogramm von „Zwischenferment" (Glucose-6-phosphat-dehydrogenase); linke Kurve 0,5 mg, rechte Kurve 1,0 mg Enzym

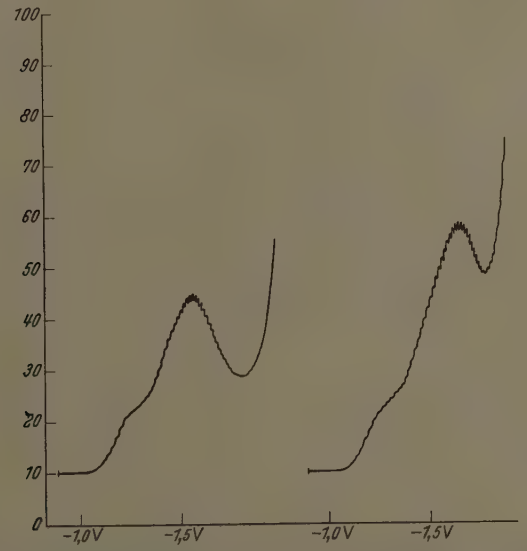


Abb. 10. Enolase: linke Kurve 1,0 mg Enzym, rechte Kurve nach 30 min Stehen im NH_3/NH_4^+-Puffer

Wie bereits von anderen Autoren[3] beschrieben, besitzen schwefelfreie Proteine, wie Gelatine und Seidenfibroin, ebenso Protamine überhaupt keinen katalytischen Effekt; die Co^{2+}-Reduktionsstufe ist vollständig unterdrückt.

Die Kurvenform ändert sich mit der Zeit nicht, auch nicht nach Zusatz von PCMB.

5. Insulin

Die Strukturaufklärung des Insulins durch SANGER[7] hat gezeigt, daß Insulin drei SS-Brücken enthält. Wird eine dieser SS-Brücken durch Hydrolyse oder Reduktion geöffnet, so verliert das Molekül seine physiologische Wirksamkeit. Eine Reoxydation ist nicht mehr möglich.

Als Vertreter eines reinen SS-Proteins besitzt Insulin eine stark ausgeprägte katalytische Wasserstoffwelle (Abb. 14, linke Kurve).

Nach partieller Hydrolyse (2 n Natronlauge bei 35° C) zeigt sich im polarographischen Kurvenbild, abhängig von der Dauer der Hydrolyse, das Auftreten einer neuen, zweiten katalytischen Welle, wobei das ursprüngliche Maximum in dem Maße absinkt, wie die zweite Welle an Höhe zunimmt (Abb. 15, linke Kurve). Ein Zusatz von p-Chlormercuribenzoat (PCMB) zu partiell hydrolysiertem Insulin bewirkt eine starke Erhöhung der neu entstandenen katalytischen Welle. Durchgeführte spektrophotometrische Bestimmungen nach BOYER[1] lieferten den Beweis, daß im Insulin Sulfhydrylgruppen durch partielle Hydrolyse entstehen. Die neuentstandene katalytische Wasserstoffwelle ist deshalb mit Sicherheit die der SH-Gruppen (Abb. 15, rechte Kurve).

Um eine Beteiligung anderer funktioneller Gruppen des Insulins am Mechanismus der katalytischen Wasserstoffwellen zu prüfen, wurden einige Insulinderivate untersucht*.

Kristallisiertes Insulin mit einem Zinkgehalt von 0,35% und *entzinktes Insulin* (0,01% Zn) haben praktisch das gleiche Kurvenbild (vgl. Abb. 14, rechte Kurve).

„*Insulin P*" kann durch Behandlung von Insulin mit Phosgen gewonnen werden[6]. Phosgen reagiert dabei mit den freien Aminogruppen des Moleküls. Es besteht im Polarogramm kein Unterschied zu anderen Insulinderivaten.

Depot-Insulin enthält 0,6 mg Iridin je 100 E. Das Polarogramm zeigt die gleichen Eigenschaften wie das des normalen Insulins. Versetzt man jedoch Depot-Insulin mit steigender Menge Protamin (Iridin), so verschwindet sowohl die katalytische Welle als die Co^{2+}-Reduktionsstufe (Abb. 16 und 17).

---

* Der Hormon-Chemie München, insbesondere Herrn Dr. H. MITTENZWEI, danken wir für die Insulinproben.

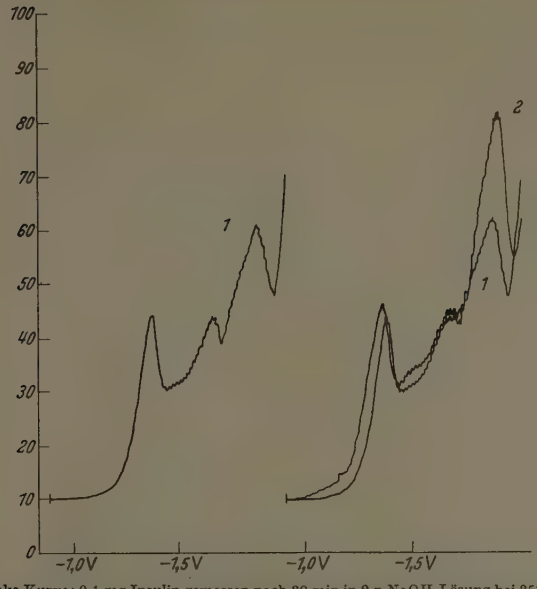


Abb. 15. Linke Kurve: 0,1 mg Insulin gemessen nach 30 min in 2 n NaOH-Lösung bei 35° C (Kurve *1*); rechte Kurven: Versuch wie linke Kurve (Kurve *1*), danach Zusatz von 2 μMol PCMB (Kurve *2*)

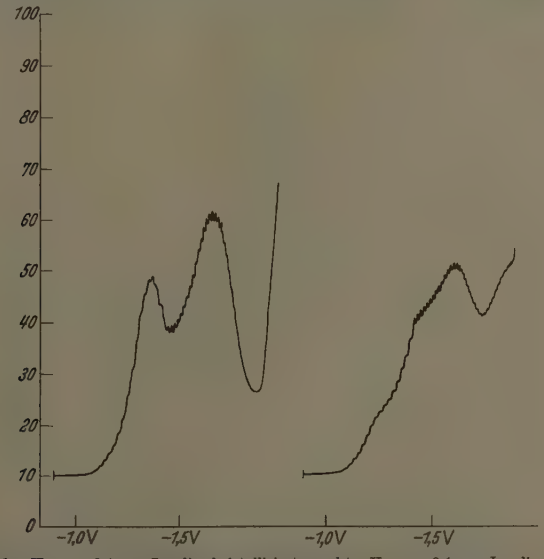


Abb. 16. Linke Kurve: 0,1 mg Insulin kristallisiert; rechte Kurve: 0,1 mg Insulin kristallisiert + 0,5 mg Iridin

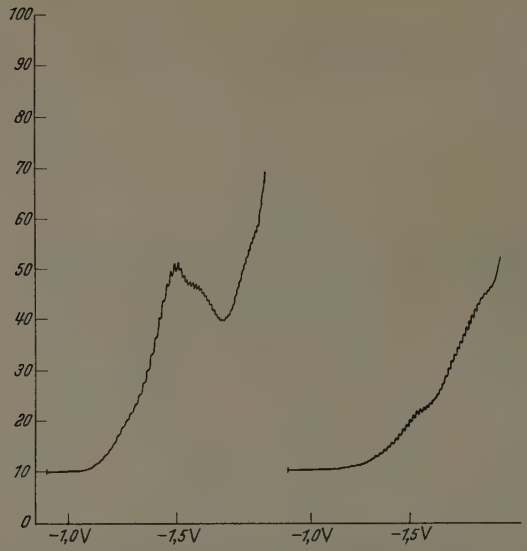


Abb. 17. Linke Kurve: 0,1 mg Insulin kristallisiert + 1 mg Iridin; rechte Kurve: 0,1 mg Insulin kristallisiert + 2 mg Iridin

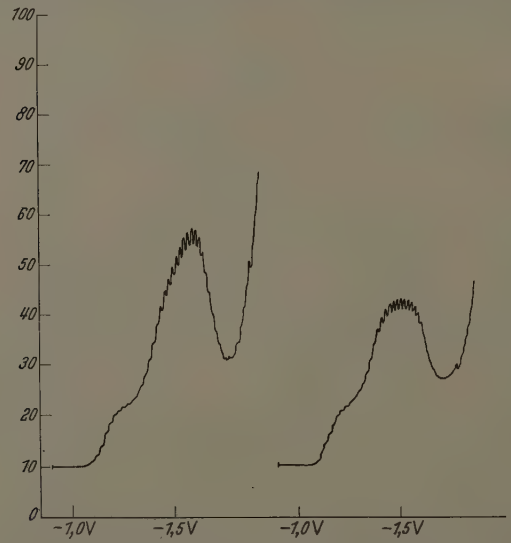


Abb. 18. Linke Kurve: 1 mg Aldolase; rechte Kurve: 1 mg Aldolase reduziert mit Natriumsulfit und Zusatz von Harnstoff (Endmolarität an Harnstoff 5 m)

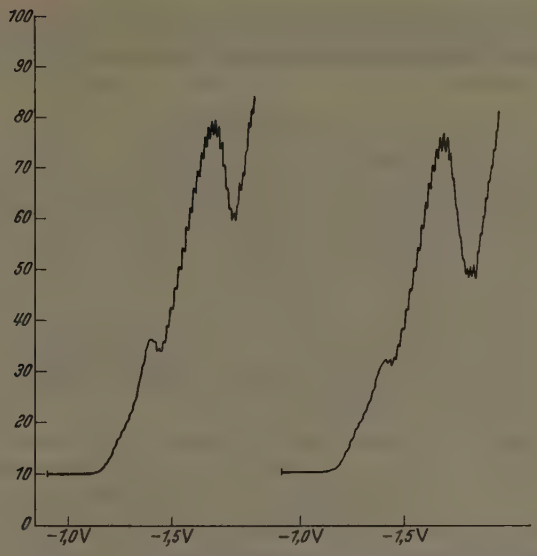


Abb. 19. Linke Kurve: 10 mg Trypsin; rechte Kurve: 10 mg Trypsin + Harnstoffzusatz (Endmolarität an Harnstoff 8 m)

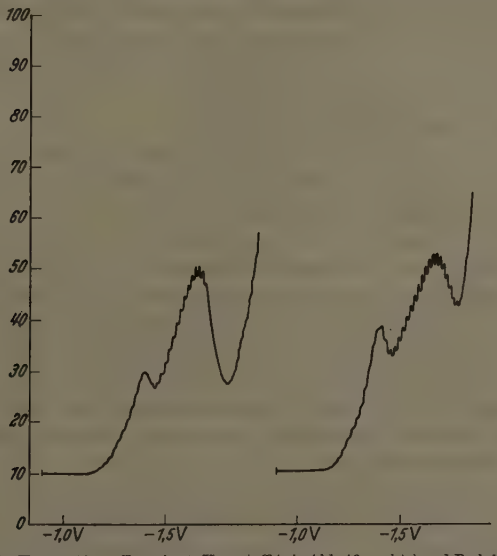


Abb. 20. Linke Kurve: 10 mg Trypsin + Harnstoff (wie Abb. 19, rechts) und Reduktion mit Natriumsulfit (100 mg); rechte Kurve: 10 mg Trypsin mit Natriumsulfit (100 mg) reduziert ohne Harnstoffzusatz

Bei diesem Effekt handelt es sich wohl um eine Bildung von Einschlußverbindungen, wobei das überschüssige Protamin die SS-Gruppe des Insulins „maskiert".

6. Versuche mit Harnstoff

Wenn unsere bisherigen Befunde richtig sind, müßte die Reduktion von SS-Gruppen eines Proteins sich polarographisch durch ein Verschwinden bzw. eine Erniedrigung der typischen „SS-Welle" erkennen lassen.

Wir reduzieren deshalb die SS-Enzyme Aldolase und Trypsin mit Natriumsulfit und wir konnten dabei ein verschiedenes Verhalten beider Enzyme beobachten:

a) Nach 5stündigem Inkubieren von 1 mg *Aldolase* mit 100 mg Natriumsulfit bei Zimmertemperatur in 1 ml Phosphatpuffer (End-p_H 7—8) gelöst, läßt sich im Polarogramm nur eine minimale Abnahme der katalytischen Wellenhöhe verfolgen.

Nach Zusatz von Harnstoff (Endkonzentration 5 m; 2 Parallelversuche) konnte jedoch die stattgefundene Reduktion nachgewiesen werden: Das Maximum bei — 1,6 V ist deutlich erniedrigt, ein PCMB-Zusatz führt zum Anstieg der Wellenhöhe, was ebenfalls auf entstandene freie SH-Gruppen hinweist (Abb. 18).

b) 10 mg *Trypsin* in 1 ml Phosphatpuffer wurden mit 100 mg Natriumsulfit ohne und mit Harnstoffzusatz 7 Std bei Zimmertemperatur inkubiert. Bei der Messung der katalytischen Wasserstoffwellen zeigte es sich, daß während des Versuches etwa die Hälfte der polarographisch erfaßbaren SS-Gruppen des Trypsins sowohl mit als auch ohne Harnstoffzusatz reduziert wurden (Abb. 19 und 20).

Die Auffaltung der Peptidketten mit Harnstoff hat demnach im Gegensatz zum Enzym Aldolase, bei Trypsin keinen Einfluß auf die Reduzierbarkeit der SS-Gruppen mit Sulfit.

Zusammenfassung

An kristallisierten Enzymen des biologischen Stoffwechsel wird gezeigt, daß bei der Polarographie nur die schwefelhaltigen Proteine katalytische Wasserstoffwellen geben. Von den in der Literatur beschriebenen „Doppelstufen" der Proteine besitzt nur die im negativeren Potentialbereich liegende Welle die eigentliche katalytische Funktion. Die erste Vorwelle von Proteinen verschwindet, wenn die polarographische Messung bei 0° C durchgeführt wird.

In Proteinen sind nur Disulfidgruppen katalytisch wirksam. Sogenannte „reine Sulfhydryl-Enzyme" haben keinen katalytischen Effekt. Typische „SH-Enzyme" können jedoch polarographisch als p-Chloromercuribenzoatkomplexe gemessen werden.

Durch Harnstoffzusatz bei der polarographischen Messung von Proteinen gelingt es, zwischen maskierten und freien Sulfhydryl- oder Disulfidgruppen an Enzymen zu definieren.

Literatur

[1] Boyer, P. D.: J. Amer. chem. Soc. **76**, 4331 (1954). — [2] Brdička, R.: Collect. Trav. chim. Tchécoslov. **5**, 112 (1933); vgl. diese Z. **96**, 207 (1934). — Heyrovský, J.: Angew. Chem. **72**, 427 (1960). — [3] Fassbender, M.: Diss. Univ. Bonn (1944); zit. nach M. v. Stackelberg: Polarographische Arbeitsmethoden. — [4] Gudbjarnason, S.: Diss. Techn. Hochsch. München (1959). — [5] Lamprecht, W., S. Gudbjarnason u. H. Katzlmeier: diese Z. **181**, 201 (1961). — [6] Mohnike, G., G. Schnuchel, I. Kupffer u. W. Langenbeck: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **294**, 12 (1953). — [7] Sanger, F.: Biochemic. J. **60**, 541 (1955); Advances Protein Chem. **7**, 1 (1952).

Priv.-Doz. Dr. W. Lamprecht, Organ.-chem. Institut, Technische Hochschule München 2, Arcisstr. 21 und I. Medizinische Klinik der Universität München 15, Ziemssenstraße 1a

---

3. Physikalische Methoden

Untersuchungslaboratorium des VEB Chemische Werke Buna, Schkopau

Beitrag zur infrarotspektroskopischen Simultananalyse

II. Mitteilung*

Von

E. O. Schmalz und **W. Kimmer**

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 19. September 1960)

Die quantitative infrarotspektroskopische Analyse eines Stoffsystems beruht unter normalen Bedingungen auf der Messung der Durchlässigkeit bzw. Extinktion einer oder mehrerer ausgewählter Analysenbanden. Mit Hilfe der an Reinsubstanzen bestimmten Extinktionskoeffizienten der das System aufbauenden Komponenten und der bekannten Schichtdicke der Probeküvette oder Folie können dann über das Lambert-Beersche Gesetz die gesuchten Konzentrationen der Einzelkomponenten berechnet werden. Liegen jedoch unlösliche oder nur teilweise lösliche Verbindungen vor, z. B. Kautschuk oder andere Hochpolymere, so ist bei der quantitativen infrarotspektroskopischen Analyse außer der gesuchten Konzentration auch die Schichtdicke unbekannt, da sich z. B. der Kautschuk weder in eine definierte Folienform bringen läßt, noch zu Pulver zerkleinert werden kann.

* I. Mitteilung: diese Z. **170**, 132 (1959).

Um auch diese unlöslichen oder nur quellfähigen Stoffsysteme einer quantitativen Infrarotanalyse zugängig zu machen, wurde ein Verfahren erarbeitet, nach dem die Bestimmung der prozentualen Zusammensetzung auch ohne Kenntnis der Schichtdicke möglich ist. Das Verfahren wurde zunächst speziell auf die quantitative Analyse der Isomeren in unlöslichen, nur quellfähigen Kautschuktypen angewendet, es läßt sich aber auch auf die quantitative Analyse anderer unlöslicher Proben oder auf die Analyse flüssiger, unverdünnter Stoffsysteme anwenden.

Theoretische Grundlagen

Zur Eichung des Verfahrens ist das Vorliegen einer Substanz *bekannter quantitativer Zusammensetzung* erforderlich. Die für diese Substanz ausgewählten Analysenbanden dürfen durch Fremdabsorptionseinflüsse nicht beeinflußt werden, d. h. die einzelnen Banden müssen nach dem Basislinienverfahren auswertbar sein. Dann gilt für die Extinktion der Komponente x

$$E_x = \varepsilon_x^0 \cdot c \cdot d \tag{1a}$$

c = Konzentration der Einzelkomponente
d = Schichtdicke
ε_x^0 = Extinktionskoeffizient der reinen Komponente x.

An Stelle von c kann man schreiben

$$c = b_x \cdot c_g, \tag{1b}$$

wobei c_g die Gesamtkonzentration und b_x den Molenbruch der Komponente x im Gesamtsystem darstellt. Setzt man (1b) in (1a) ein, so ergibt sich:

$$E_x = \varepsilon_x^0 \cdot b_x \cdot c_g \cdot d\,. \tag{1c}$$

Faßt man die unbekannten Größen zusammen

$$c_g \cdot d = a\,, \tag{2}$$

dann kann mittels der bekannten Werte E_x und b_x der gesuchte Extinktionskoeffizient bis auf den Faktor a bestimmt werden:

$$\frac{E_x}{b_x} = \varepsilon_x^0 \cdot a\,. \tag{3a}$$

Liegt ein 3-Komponentensystem vor, dann ergibt sich für die anderen beiden Komponenten y und z:

$$\frac{E_y}{b_y} = \varepsilon_y^0 \cdot a \tag{3b}$$

$$\frac{E_z}{b_z} = \varepsilon_z^0 \cdot a\,. \tag{3c}$$

Zweckmäßigerweise multipliziert man alle 3 Gleichungen (3a—c) mit einem Faktor f, wobei f so gewählt wird, daß für eine der 3 Gleichungen, z.B. für (3a), gilt:

$$\varepsilon_x^0 \cdot a \cdot f = 1 \text{ (rechte Seite der Gleichung)} \tag{4a}$$

bzw.

$$\frac{E_x}{b_x} \cdot f = 1 \text{ (linke Seite der Gleichung)} . \tag{4b}$$

Dann gilt für f

$$f = \frac{b_x}{E_x} . \tag{4c}$$

Damit gehen die Gl. (3a—c) über in:

$$\frac{E_x}{b_x} \cdot f = \varepsilon_x^0 \cdot a \cdot f = A = 1 \tag{4d}$$

$$\frac{E_y}{b_y} \cdot f = \varepsilon_y^0 \cdot a \cdot f = B . \tag{4e}$$

$$\frac{E_z}{b_z} \cdot f = \varepsilon_z^0 \cdot a \cdot f = C . \tag{4f}$$

Wird nun eine Probe *unbekannter* Zusammensetzung spektroskopiert, dann ergeben sich folgende Beziehungen:

$$E_x' = \varepsilon_x^0 \cdot b_x' \cdot c_g' \cdot d' \tag{5a}$$

$$c_g' \cdot d' = m \tag{5b}$$

$$E_x' = \varepsilon_x^0 \cdot b_x' \cdot m \tag{6a}$$

$$E_y' = \varepsilon_y^0 \cdot b_y' \cdot m \tag{6b}$$

$$E_z' = \varepsilon_z^0 \cdot b_z' \cdot m . \tag{6c}$$

In diesen 3 Gleichungen (6a—c) können nun die Größen ε_x^0, ε_y^0 und ε_z^0 durch die Beziehungen (4d—4f) ersetzt werden, wobei sich ergibt:

$$E_x' = A \cdot \frac{1}{f \cdot a} \cdot b_x' \cdot m \tag{7a}$$

$$E_y' = B \cdot \frac{1}{f \cdot a} \cdot b_y' \cdot m \tag{7b}$$

$$E_z' = C \cdot \frac{1}{f \cdot a} \cdot b_z' \cdot m \tag{7c}$$

worin

$$\frac{E_x}{b_x} \cdot f = A \tag{8a}$$

$$\frac{E_y}{b_y} \cdot f = B \tag{8b}$$

und

$$\frac{E_z}{b_z} \cdot f = C \tag{8c}$$

gesetzt wurden.

Die drei unbekannten Größen $\frac{1}{f \cdot a} \cdot m$ kann man zu einer Konstanten K zusammenfassen:

$$\frac{m}{f \cdot a} = K . \tag{9}$$

Mit (9) gehen die Gl. (7a—c) über in

$$E_x' = A \cdot b_x' \cdot K \tag{10a}$$

$$E_y' = B \cdot b_y' \cdot K \tag{10b}$$

$$E_z' = C \cdot b_z' \cdot K . \tag{10c}$$

Durch Umformung ergibt sich hieraus:

$$\frac{E_x'}{A} = K \cdot b_x' \tag{11a}$$

$$\frac{E_y'}{B} = K \cdot b_y' \tag{11b}$$

$$\frac{E_z'}{C} = K \cdot b_z' . \tag{11c}$$

Außer diesen 3 Gleichungen muß noch gelten:

$$(b_x' + b_y' + b_z') = 1 . \tag{12a}$$

Aus der Summe der Gleichungen (11a—c) erhält man dagegen

$$K (b_x' + b_y' + b_z') = \frac{E_x'}{A} + \frac{E_y'}{B} + \frac{E_z'}{C} . \tag{12b}$$

Dividiert man nun die Gl. (11a—c) durch den berechneten Faktor K, dann erhält man die gesuchte Zusammensetzung der unbekannten Probe in Prozenten:

$$b_x' \,\% = \frac{E_x'}{A} \cdot \frac{100}{K} \tag{13a}$$

$$b_y' \,\% = \frac{E_y'}{B} \cdot \frac{100}{K} \tag{13b}$$

$$b_z' \,\% = \frac{E_z'}{C} \cdot \frac{100}{K} . \tag{13c}$$

Mit Hilfe der an Proben bekannter Zusammensetzung nach (8a—c) zu ermittelnden Werte A, B und C und des nach (12b) erhaltenen Wertes für K kann man mit den Beziehungen (13a—c) ohne Kenntnis der Schichtdicke durch reine Extinktionsmessung relativ einfach die prozentuale Zusammensetzung eines Stoffsystems berechnen.

Liegen jedoch nur Proben unbekannter quantitativer Zusammensetzung vor, so muß man durch mathematische Kopplung der an unbekannten Lösungen gleicher qualitativer aber verschiedener quantitativer Zusammensetzung erhaltenen Meßwerte zunächst die prozentuale Zusammensetzung berechnen, worüber an anderer Stelle bereits berichtet wurde[3,4]. Die Bestimmung der Größen *A*, *B* und *C* erfolgt dann an diesen Lösungen, deren Zusammensetzung indirekt ermittelt wurde.

Die vorliegenden Proben werden entweder im angequollenen (Kautschuk) oder im unverdünnten Zustand (flüssige Proben ohne Verdünnungsmittel) spektroskopiert. Für die praktische Auswertung ergeben sich daraus folgende Fälle:

Fall 1. Sind die Extinktionskoeffizienten konzentrationsunabhängig, dann gelten die Beziehungen (13a—c) exakt. Dieser Idealfall tritt nach den vorliegenden Messungen z.B. beim Synthesekautschuk oder einigen unverdünnten Mischungen stellungsisomerer Aromaten (z.B. Diäthylbenzol) auf, trifft aber nicht für alle Stoffsysteme zu.

Fall 2. a) Sind die Extinktionskoeffizienten konzentrationsabhängig und werden die zu untersuchenden Lösungen nicht verdünnt, dann ist eine Auswertung über Eichkurven möglich (Modellbeispiel: CS_2-C_6H_6-Mischung als Zweikomponentensystem).

b) Sind die Extinktionskoeffizienten konzentrationsabhängig und müssen z.B. infolge zu starker Strahlungsabsorption die zu untersuchenden Lösungen verdünnt werden, dann ist eine Auswertung über Eichkurven nur näherungsweise möglich (Modellbeispiel: Verdünnung einer Mischung CS_2-C_6H_6 mit CCl_4).

Im folgenden werden diese Auswertemöglichkeiten an einigen Beispielen erläutert.

Beispiele. Fall 1

a) Die quantitative infrarotspektroskopische Bestimmung von m- neben p-Diäthylbenzol ohne Anwendung eines Verdünnungsmittels und ohne Kenntnis der Schichtdicke

Zur Untersuchung dieses Zweistoffsystems waren zunächst die Größen A und B an Diäthylbenzollösungen bekannter Zusammensetzung zu ermitteln. Hierzu wurden die beiden Reinisomeren wie folgt gemischt:

Lösung	% m-Diäthylbenzol	% p-Diäthylbenzol
1	100	—
2	80,3	19,7
3	59,7	40,3
4	39,1	60,9
5	19,5	80,5

Von diesen Lösungen wurde jeweils 1 Tr. an den Rand einer NaCl-Scheibe gebracht und durch Darüberschieben einer zweiten NaCl-Scheibe ein feiner, von

Luftresten freier Flüssigkeitsfilm erzeugt, dessen IR-Spektrum registriert wurde. Zur Auswertung gelangten folgende Absorptionsbanden:

m-Diäthylbenzol: 798 cm^{-1}
p-Diäthylbenzol: 830 cm^{-1}.

Es wurden folgende Extinktionen ermittelt:

Lösung	E_m	E_p
1	0,480	—
2	0,384	0,223
3	0,297	0,464
4	0,198	0,706
5	0,093	0,863

Mit diesen gemessenen Extinktionen und der bekannten quantitativen Zusammensetzung der vorliegenden Proben wurden nach den Beziehungen (8a) bzw. (8b) die gesuchten Größen A und B berechnet:

$$A = \frac{E_p}{b_p} \cdot f = 1 \text{ (festgelegt)} \tag{14a}$$

$$B = \frac{E_m}{b_m} \cdot f\,. \tag{14b}$$

In den Gl. (3a) und (3b) erscheinen Quotienten der Form $\frac{E_x}{b_x}$ bzw. $\frac{E_y}{b_y}$, die im vorstehenden Text als „reduzierte Extinktionen" bezeichnet werden. Dividiert man (3a) durch (3b), so erhält man das „Verhältnis der reduzierten Extinktionen":

$$\frac{\frac{E_x}{b_x}}{\frac{E_y}{b_y}} = \frac{\varepsilon_x^0}{\varepsilon_y^0}. \tag{15}$$

Ist dieses Verhältnis für die einzelnen Lösungen verschiedener Konzentration konstant, so sind die Extinktionskoeffizienten konzentrationsunabhängig, d.h. Fall 1 ist erfüllt; andernfalls ist die Konzentrationsabhängigkeit zu berücksichtigen (vgl. später).

Bildet man die reduzierten Extinktionsverhältnisse für die angegebenen Diäthylbenzolmischungen, so erhält man:

Lösung	$\frac{E_m}{b_m}$ / $\frac{E_p}{b_p}$
1	—
2	0,420
3	0,432
4	0,439
5	0,444
	$\varnothing 0{,}434 = B$

Dieses Ergebnis zeigt einen geringen Gang, der aber vernachlässigt werden kann; Fall 1 ist also für dieses Stoffsystem erfüllt.

Mit diesen Werten für A und B wurden die weiteren Rechnungen durchgeführt. Den zur Berechnung der Zusammensetzung nach Gl. (13) des weiteren benötigten Wert K erhält man nach (12b):

$$K = \frac{E_p'}{A} + \frac{E_m'}{B} \tag{16}$$

E_p' = gemessene Extinktion des p-Isomeren
E_m' = gemessene Extinktion des m-Isomeren.

Zur Erprobung des Verfahrens wurden 3 Diäthylbenzol-Testmischungen folgender Zusammensetzung hergestellt:

	% m-DÄB	% p-DÄB
Mischung I	70,1	29,9
Mischung II	50,1	49,9
Mischung III	30,1	69,9

Von diesen Mischungen wurde, wie beschrieben, ein dünner Flüssigkeitsfilm zwischen 2 NaCl-Fenster erzeugt und spektroskopiert. Es wurden folgende Extinktionen gemessen:

	E_p	E_m
Mischung I	0,339	0,331
Mischung II	0,553	0,241
Mischung III	0,749	0,171

Für die einzelnen Größen in (13) ergibt sich:

	$\frac{E_p'}{A}$	$\frac{E_m'}{B}$	K	$\frac{100}{K}$
Mischung I	0,339	0,762	1,1026	90,7
Mischung II	0,553	0,556	1,1096	90,1
Mischung III	0,749	0,395	1,1450	87,34

und für die Zusammensetzung in Prozenten:

	% p-DÄB			% m-DÄB		
	Soll	Ist	Δ in %	Soll	Ist	Δ in %
Mischung I	29,9	30,8	+ 0,9	70,1	69,2	− 0,9
Mischung II	49,9	49,9	± 0	50,1	50,1	± 0
Mischung III	69,9	65,5	− 4,4	30,1	34,5	+ 4,4

Dieses Beispiel zeigt, daß es im Falle der Konzentrationsunabhängigkeit der Extinktionskoeffizienten möglich ist, Stoffsysteme im unverdünnten Zustand ohne Kenntnis der Schichtdicke innerhalb der bei spektroskopischen Messungen auftretenden Fehler quantitativ zu bestimmen.

Ein weiteres, technisch wichtiges Beispiel hierfür ist die quantitative IR-spektroskopische Bestimmung der Isomeren in gequollenem synthetischen Kautschuk.

b) Die quantitative infrarotspektroskopische Bestimmung der 1,2-, 1,4 cis- und 1,4 trans-Isomeren im gequollenen Synthesekautschuk

Die Polymerketten des Synthesekautschuks bestehen aus 1,2-, 1,4 cis- und 1,4 trans-Isomeren. Die Bestimmung des prozentualen Anteils dieser

Isomeren im Kautschukmolekül ist für den Kautschukchemiker von besonderem Interesse. Alle drei Isomeren absorbieren bei verschiedenen Wellenzahlen:

1,2-Isomere bei 910 cm^{-1}
1,4 trans-Isomere bei 970 cm^{-1}
1,4 cis-Isomere bei 740 cm^{-1}.

Die bisherigen infrarotspektroskopischen Kautschukisomerenanalysen waren auf lösliche Kautschuktypen beschränkt. Die Bestimmung der Extinktionskoeffizienten der Kautschukreinisomeren und die quantitative Bestimmung der Isomeren selbst erfolgte dabei entweder durch mathematische Kopplung der an Kautschuklösungen gleicher qualitativer aber verschiedener quantitativer Zusammensetzung erhaltenen Meßwerte[4,5] oder nach älteren Verfahren über eine indirekte Eichung der Kautschukabsorptionsbanden mit Hilfe strukturähnlicher Olefine[1,2].

Die quantitative infrarotspektroskopische Bestimmung der Kautschukisomeren in unlöslichen, nur quellfähigen Kautschuktypen setzt, ähnlich der quantitativen Bestimmung stellungsisomerer Aromaten (vgl. 1a), die Kenntnis der Größen *A*, *B* und *C* für die 3 Kautschukisomeren voraus, die an Kautschuktypen bekannter Zusammensetzung, also löslichem Kautschuk, bestimmt werden müssen. Sind diese 3 Größen bestimmt worden, so wird eine Gummiprobe mit CS_2 angequollen, zwischen zwei NaCl-Fenster gepreßt und im Wellenzahlenbereich 600 bis 1100 cm^{-1} spektroskopiert. Mit den aus den Durchlässigkeitswerten der Kautschukabsorptionsbanden errechenbaren Extinktionen werden dann nach den Beziehungen (13a—c) die prozentualen Anteile der Kautschukisomeren bezogen auf 100%ige Ungesättigtheit berechnet.

Zur Bestimmung der *A*-, *B*- und *C*-Werte der 3 Kautschukisomeren werden eine Reihe löslicher Kautschuktypen analysiert und die Mittelwerte aus den einzelnen Messungen gebildet. So wurden von uns folgende Kautschuktypen zur Eichung verwendet:

Buna S 4 T — *Krylene*

Serie	% 1,2-Isomeren	% 1,4 trans-Isomeren	Serie	% 1,2-Isomeren	% 1,4 trans-Isomeren
36	17,7	81,4	32	19,7	86,4
40	15,7	82,1	35	16,1	84,7
45	18,1	86,5	42	14,2	78,5
	⌀ 17,2%	83,3%		⌀ 16,7%	83,2%

Buna S 4 — *Buna S 3*

Serie	% 1,2-Isomeren	% 1,4 trans-Isomeren	Serie	% 1,2-Isomeren	% 1,4 trans-Isomeren
17	16,4	71,5	19	13,1	52,3
18	17,1	72,4	37	13,9	64,8
25	17,6	69,7	41	12,9	58,3
	⌀ 17,0%	71,2%		⌀ 13,3%	58,5%

Plastikator 32 *Buna 85*

Serie	% 1,2-Isomeren	% 1,4 trans-Isomeren	Serie	% 1,2-Isomeren	% 1,4 trans-Isomeren
33	77,0	22,9	1	46,5	45,0
38	79,9	21,5	2	44,2	40,0
39	76,8	20,3	3	45,0	42,0
44	67,9	23,5	4	46,5	40,0
48	70,2	16,6	5	45,4	41,5
49	65,6	15,9		⌀ 45,5%	41,7%
50	67,6	15,5			
51	65,4	19,1			
	⌀ 71,3%	19,4%			

Buna S 3, Plastikator 32 und Buna 85 enthalten außer 1,2- und 1,4 trans-Isomeren noch 1,4 cis-Anteile.

Von diesen Kautschuktypen bekannter Zusammensetzung wurden verschiedene Proben mit CS_2 angequollen, die Extinktionen aus den IR-Spektren ermittelt und die reduzierten Extinktionsverhältnisse gebildet:

	% 1,4 trans	% 1,2	E_{970}	E_{910}	$\frac{E_{970}}{b_{970}} : \frac{E_{910}}{b_{910}}$
Plastikator 32	19,4	71,3	0,069	0,394	0,643
Buna 85	41,7	45,5	0,363	0,577	0,686
Buna S 3	58,5	13,3	0,252	0,096	0,596
Buna S 4	71,2	17,0	0,317	0,110	0,675
Krylene	83,2	16,7	0,510	0,162	0,631
S 4 T	83,3	17,2	0,335	0,106	0,651
					⌀ 0,647

Wie die Aufstellung und Abb. 1 zeigen, ist das reduzierte Extinktionsverhältnis unabhängig vom Kautschuktyp und unabhängig von seiner

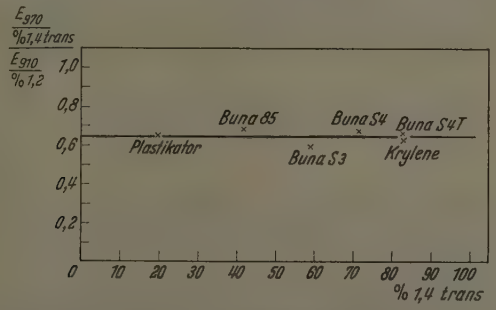


Abb. 1. Konzentrationsabhängigkeit der reduzierten Extinktionsverhältnisse verschiedener Kautschuktypen

Zusammensetzung. Die Auswertung kann also rein rechnerisch, ohne Anwendung von Eichkurven erfolgen (Beweis für Fall 1).

Gemäß Gl. (8a) ist

$$A = \frac{E_x}{b_x} \cdot f .$$

Dieser Ausdruck wurde für die 1,2-Isomeren gleich 1 gesetzt:

$$A = \frac{E_{910}}{b_{1,2\text{-}Isomeren}} \cdot f = 1 . \qquad (17)$$

Für B (1,4 trans-Isomere) ergibt sich dann als Durschnittswert 0,647. Um die Größe C (1,4 cis-Isomere) zu bestimmen, die gleich dem reduzierten Extinktionsverhältnis des 1,4 cis-Isomeren für $A = 1$ ist, müssen 1,4 cis-reiche Kautschukproben verwendet werden, die noch größere Anteile an 1,2- oder 1,4 trans-Isomeren aufweisen. Die Kautschukproben, mit denen die Werte für A und B bestimmt werden, sind infolge ihres niedrigen cis-Gehaltes hierfür ungeeignet. Deshalb wurde der C-Wert an anderen Kautschukproben bekannter Zusammensetzung bestimmt:

Probe	% 1,2	% 1,4 trans	% 1,4 cis
961	4,9	47,8	47,7
943	4,1	8,9	85,7
965	4,5	39,9	50,6
950	8,15	7,7	82,0

An den gequollenen Proben wurden folgende Extinktionen bestimmt:

Probe	E_{910}	E_{970}	E_{740}
961	0,061	0,444	0,118
943	0,068	0,099	0,265
965	0,096	0,491	0,149
950	0,141	0,104	0,270

Diese gemessenen Extinktionen wurden durch den dazugehörigen Prozentsatz dividiert. So wurden z.B. für die Probe 961 folgende Werte erhalten:

$\frac{E}{b}$	1,2	1,4 trans	1,4 cis
	1,227	0,928	0,246

Diese reduzierten Extinktionen wurden aus den im theoretischen Teil erwähnten Gründen auf die für A bzw. B gewonnenen Werte reduziert. Welcher Wert dabei zugrunde gelegt wird, hängt von den Fehlerwahrscheinlichkeiten ab. Im obigen Falle wurde der 1,4 trans-Anteil (47,8%) als der sicherste angenommen; es wurde also die für die 1,4 trans-Anteile erhaltene Größe auf den Wert 0,647 gebracht, d.h. alle 3 Werte wurden

mit $\frac{0{,}647}{0{,}928} = 0{,}697$ multipliziert. Für die vier angeführten cis-reichen Proben ergaben sich dabei folgende Werte (Bezugspunkte unterstrichen):

Probe	*A*	*B*	*C*
961	0,855	0,647	0,172
943	0,966	0,647	0,180
965	1,119	0,647	0,155
950	1,000	0,780	0,193
			⌀0,175

(Bei der Berechnung des *C*-Wertes der Probe 950 wurde aus Gründen der Fehlerwahrscheinlichkeit nicht auf *B*, sondern auf den Wert von $A = 1$ bezogen.)

Die Abweichungen der Werte in der Spalte für *A* vom Sollwert = 1 und die Abweichung des letzten Wertes der *B*-Spalte vom Sollwert = 0,647 sind auf Fehlereinflüsse zurückzuführen, die bei den niederen Prozentgehalten an 1,2- und 1,4 trans-Isomeren in den gesamten Proben unvermeidlich sind.

Damit ergeben sich für die gesuchten reduzierten Extinktionsverhältnisse der drei Kautschukisomeren folgende Größen:

1,2-Isomere *A* = 1,000 festgesetzt
1,4 trans-Isomere *B* = 0,647 ± 2 % (Fehler des Mittelwertes)
1,4 cis-Isomere *C* = 0,175 ± 4,6% (Fehler des Mittelwertes).

Zum Beweis für die Anwendbarkeit des Verfahrens wurden verschiedene Kautschukproben einmal in gelöster, zum anderen in gequollener Form untersucht:

Probe	% 1,2 Isomeren		% 1,4 trans-Isomeren		% 1,4 cis-Isomeren	
	Lösung	Quellzustand	Lösung	Quellzustand	Lösung	Quellzustand
942	6,0	4,7	7,3	5,4	87,0	89,9
958	5,7	5,5	5,7	5,2	85,7	89,2
918	1,3	1,6	2,6	2,1	93,8	96,2
984	4,7	4,0	53,0	52,2	42,1	43,9

Die Übereinstimmung zwischen den Lösungs- und Quellwerten ist also sehr zufriedenstellend; ähnliche Ergebnisse wurden bei der Messung einer Vielzahl anderer Kautschukproben erhalten. Die Werte für *A*, *B* und *C* brauchen nur einmal bestimmt zu werden, sie hängen aber naturgemäß vom verwendeten Quellmittel ab. Die quantitative infrarotspektroskopische Bestimmung der Kautschukisomeren im Quellzustand

ist wesentlich rascher durchzuführen als eine Kautschukanalyse in Lösung. Während zur vollständigen exakten Analyse eines löslichen Kautschuks bisher, je nach Kautschuktyp, 1—2 Tage benötigt wurden, braucht man nach dem beschriebenen Verfahren bei gleicher Analysengenauigkeit hierzu nur noch 1 Std.

Fall 2

Sind die Extinktionskoeffizienten bzw. das Verhältnis der reduzierten Extinktionen konzentrationsabhängig, dann kann eine rein rechnerische Auswertung mit Hilfe der an Proben bekannter Zusammensetzung ermittelten Größen A, B und C nicht mehr exakt erfolgen; Fall 1 ist dann nicht mehr erfüllt. Wie die nachfolgend wiedergegebenen Untersuchungsergebnisse zeigen, ist es in solchen Fällen möglich, die quantitative Zusammensetzung eines Stoffsystems ohne Kenntnis der verwendeten Schichtdicke über vorher berechnete Eichkurven zu ermitteln.

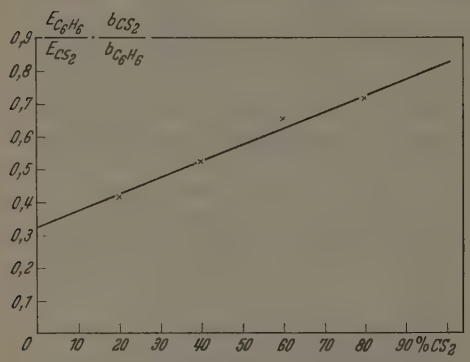


Abb. 2. Abhängigkeit des reduzierten Extinktionsverhältnisses von der Konzentration an CS_2

Zur Untersuchung gelangten CS_2-C_6H_6-Modellmischungen (Zweikomponentensystem). Es wurden folgende Banden ausgewertet:

CS_2 2150 cm^{-1}
C_6H_6 1810 cm^{-1}

Für die einzelnen Mischungen wurden folgende reduzierte Extinktionsverhältnisse bestimmt:

Mischung	% C_6H_6	% CS_2	$\frac{E_{C_6H_6}}{E_{CS_2}}$	$\frac{E_{C_6H_6}}{E_{CS_2}} \cdot \frac{b_{CS_2}}{b_{C_6H_6}}$
1	100	0		—
2	80	20	1,693	0,423
3	60	40	0,788	0,526
4	40	60	0,436	0,655
5	20	80	0,181	0,725
6	0	100	0,000	—

Wie Abb. 2 zeigt, ist das reduzierte Extinktionsverhältnis nicht konzentrationsunabhängig, wie es für die Auswertung nach Fall 1 erforderlich wäre. Es ist aber möglich, Eichkurven zu berechnen, da für jede unver-

dünnte Mischung ein entsprechendes Bandenverhältnis berechnet werden kann. Aus der Zeichnung (Abb. 2) kann die Abhängigkeit zwischen $\frac{E_{C_6H_6}}{E_{CS_2}} \cdot \frac{b_{CS_2}}{b_{C_6H_6}}$ und den Prozentgehalten an CS_2 und C_6H_6 abgelesen und damit $\frac{E_{C_6H_6}}{E_{CS_2}}$ gegen Prozent C_6H_6 aufgetragen werden.

Im einzelnen ergaben sich die in Tab. 1 angeführten folgenden Werte.

Tabelle 1

$\frac{E_{C_6H_6}}{E_{CS_2}} \cdot \frac{\%\ CS_2}{\%\ C_6H_6}$	% CS_2	$\frac{\%\ C_6H_6}{\%\ CS_2}$	$\frac{E_{C_6H_6}}{E_{CS_2}}$	$\frac{E_{CS_2}}{E_{C_6H_6}}$
0,325	0,0	∞	∞	0
0,350	5,1	18,608	6,5128	0,1535
0,375	10,2	8,804	3,3015	0,3029
0,400	15,3	5,536	2,2144	0,4516
0,425	20,4	3,902	1,6584	0,6030
0,450	25,5	2,922	1,3147	0,7606
0,475	30,5	2,279	1,0824	0,9239
0,500	35,6	1,809	0,9045	1,1056
0,525	40,6	1,463	0,7681	1,3019
0,550	45,5	1,193	0,6562	1,5241
0,575	50,6	0,9763	0,5614	1,7814
0,600	55,6	0,7986	0,4791	2,0872
0,625	60,6	0,6502	0,4064	2,4610
0,650	65,6	0,5244	0,3409	2,9338
0,675	70,6	0,4164	0,2811	3,5576
0,700	75,5	0,3245	0,2272	4,4023
0,725	80,5	0,2422	0,1756	5,6941
0,750	85,4	0,1710	0,1282	7,7991
0,775	90,4	0,1062	0,0823	12,1505
0,800	95,3	0,0493	0,0395	25,3462

Man erhält auf diese Weise die in Abb. 3 gezeigten Kurven, aus denen für jedes Spektrum die Zusammensetzung direkt aus dem Bandenverhältnis ermittelt werden kann.

Mit den so erhaltenen Eichkurven wurden eine Reihe unverdünnter CS_2-C_6H_6-Mischungen untersucht und aus den gemessenen Extinktionsverhältnissen ohne Kenntnis der Schichtdicke die Zusammensetzung bestimmt:

Soll		Ist		Δ %
% CS_2	% C_6H_6	% CS_2	% C_6H_6	
76,9	23,1	77,7	22,3	± 0,8
62,5	37,5	64,4	35,6	± 1,9
50,0	50,0	50,2	49,8	± 0,2
37,5	62,5	38,1	61,9	± 0,6
23,1	76,9	22,0	78,0	± 1,1

Um den **Einfluß** der Verdünnung auf die Auswertegenauigkeit zu untersuchen (**Fall 2b**), wurden die für die Aufstellung der Eichkurve

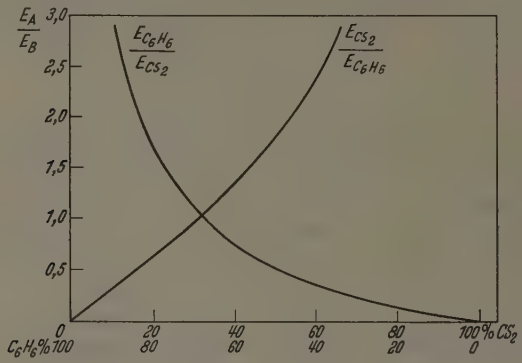


Abb. 3. Eichkurven für CS_2-C_6H_6-Mischungen

benutzten C_6H_6-CS_2-Mischungen mit CCl_4 verdünnt und die einzelnen Lösungen über die gleichen Eichkurven ausgewertet (vgl. Tab. 2).

Tabelle 2

Mischungsverhältnis C_6H_6-CS_2:CCl_4	$\frac{E_{C_6H_6}}{E_{CS_2}}$	% C_6H_6	Δ %
Mischung 2			
7:2	1,668	79,7	− 0,3
5:5	1,653	79,5	− 0,5
2:7	1,638	79,3	− 0,7
Mischung 3			
7:2	0,752	58,9	− 1,1
2:7	0,710	57,1	− 2,9

Mischungsverhältnis C_6H_6-CS_2:CCl_4	$\frac{E_{CS_2}}{E_{C_6H_6}}$	% CS_2	Δ %
Mischung 4			
7:2	2,545	61,4	+ 1,4
5:5	2,598	62,1	+ 2,1
2:7	2,985	65,2	+ 5,2
Mischung 5			
7:2	6,017	81,1	+ 1,1
5:5	5,931	80,9	+ 0,9

Die Ergebnisse zeigen, daß auch nach der Verdünnung eines Stoffsystems die Auswertung über vorher berechnete Eichkurven innerhalb gewisser Grenzen möglich ist. Mit steigender Verdünnung ist aber, besonders bei polaren Stoffen, eine Zunahme der Wechselwirkung Lösungsmittel-Gelöstes zu erwarten, wodurch die Abweichungen vom Sollwert größer werden. Eine Verdünnung sollte nach dem beschriebenen Verfahren nur dann erfolgen, wenn die zu starke Absorption des Flüssigkeitsfilmes es unbedingt erforderlich macht.

Apparatives. Die angeführten Messungen wurden mit dem Zeißschen Infrarotspektrographen UR 10 durchgeführt.

Meßdaten:

Spaltprogramm	: 4
Registriergeschwindigkeit	: 50 cm^{-1}/min
Schreibzeit	: 32 sec (für Vollausschlag)
Verstärkung	: 6
Bandbreite	: 2
Zeitkonstante	: 2
Registriermaßstab	: 32 mm/100 cm^{-1}.

Zusammenfassung

Es wird ein quantitatives infrarotspektroskopisches Untersuchungsverfahren beschrieben, mit dem es möglich ist, ohne Kenntnis der Schichtdicke der Untersuchungssubstanz die quantitative Zusammensetzung eines Stoffsystems zu ermitteln. Das Verfahren ist besonders für quantitative Untersuchungen an unlöslichen, nur quellfähigen Proben geeignet, wofür als Beispiel die Isomerenanalyse im Synthesekautschuk angeführt wird, und für die quantitative Analyse stellungsisomerer Aromaten, wobei diese im unverdünnten Zustand untersucht werden.

Voraussetzung für die Anwendbarkeit des Verfahrens ist das Vorliegen von Substanzen bekannter Zusammensetzung, mit denen die zur Auswertung benötigten Rechengrößen vor der Untersuchung unbekannter Proben bestimmt werden müssen.

Ist das Extinktionskoeffizientenverhältnis für ein gegebenes Stoffsystem konstant, d. h. konzentrationsunabhängig, dann kann die quantitative Auswertung nach erfolgter Extinktionsmessung auf rein rechnerischem Wege erfolgen. Andernfalls ist die vorherige Berechnung einer Eichkurve notwendig, über die die unbekannte Probe ausgewertet wird.

Literatur

[1] Binder, J. L.: Analyt. Chemistry **26**, 1877 (1954); vgl. diese Z. **150**, 123 (1956). — [2] Hampton, R. R.: Analyt. Chemistry **21**, 923 (1949); vgl. diese Z. **131**, 124 (1950). — [3] Kimmer, W.: Jenaer Rundschau, Heft 5/1960. — [4] Kimmer, W., u. E. O. Schmalz: diese Z. **170**, 132 (1959). — [5] Kimmer, W., u. E. O. Schmalz: Vortrag auf der Hauptversammlung der Deutschen Kautschuk-Gesellschaft, Berlin, Oktober 1960.

E. O. Schmalz und Dr. W. Kimmer, VEB Chem. Werke Buna, Schkopau 1 über Merseburg

IV. Trennmethoden zur Analyse organischer Verbindungen

1. Trennung durch kinetische Effekte

Max Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung, München

Die trägerfreie kontinuierliche Elektrophorese und ihre Anwendung

Von
K. Hannig

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 27. Oktober 1960)

Als analytische oder präparative Methode wird heute die Elektrophorese auf den verschiedensten Gebieten zur Trennung von Substanzgemischen solcher Stoffe angewandt, die elektrische Ladungen tragen und dementsprechend in einem elektrischen Feld wandern.

Die qualitative und quantitative elektrophoretische Analysenmethode, deren große Bedeutung erstmals in den klassischen Untersuchungen von Tiselius[11] (U-Rohr-Methode) erkannt wurde, ist erst durch die sogenannte Papierelektrophorese (Trägerelektrophorese) einer allgemeinen Anwendung zugänglich geworden. Grundsätzlich können diese in homogener Lösung oder in heterogenen Systemen diskontinuierlich arbeitenden Verfahren auch für präparative Aufgabenstellungen herangezogen werden[6].

Bei der freien Elektrophorese beispielsweise in der U-Rohr-Anordnung, kann jeweils die rascheste und die langsamste Komponente durch vorsichtiges Absaugen aus den beiden Schenkeln rein erhalten werden.

Bei den Verfahren der sogenannten diskontinuierlichen Träger- oder Zonenelektrophorese werden die getrennten Fraktionen nach ihrer elektrophoretischen Auftrennung durch Elution gewonnen. Dabei können die Trägermaterialien (Filtrierpapier, Glaspulver, Gele usw.) zur Aufarbeitung größerer Substanzmengen entsprechend dick gewählt wurden, oder man führt die Trennung in mit Trägermaterialien gefüllten Säulen durch.

Als eine elegantere und vor allem sehr viel leistungsfähigere Methode findet jedoch die erstmals von uns[4] und wenig später von Svensson u. Brattsten[10] beschriebene kontinuierliche Ablenkungselektrophorese bei der Auftrennung von Eiweiß und Eiweißabbauprodukten, Vitaminen, Farb- und Gerbstoffen, Kohlenhydraten usw. immer häufiger Anwendung[6].

Bei dieser Arbeitsweise strömt eine Elektrolytlösung quer zu den Kraftlinien eines elektrischen Feldes, und das zu trennende Gemisch wird kontinuierlich an einer eng begrenzten Stelle dem strömenden Medium zugeführt. Komponenten verschiedener Beweglichkeit wandern in ver-

schiedener Richtung und können nach Durchwandern der Anordnung kontinuierlich an verschiedenen Stellen entnommen werden.

Die Durchführung dieses Trennprinzipes innerhalb heterogener Systeme, vor allem bei Verwendung von Filtrierpapier oder Filtrierkarton[5,8] als Träger, bietet den Vorteil, daß die dafür benötigten Apparaturen verhältnismäßig einfach gestaltet werden können. Auf besondere Maßnahmen zur Vermeidung von Turbulenz und Konvektion, Erschütterungen usw. kann verzichtet werden. Es liegt übrigens im Prinzip dieser Arbeitsweise, daß sich Adsorptionseffekte auf die Trennschärfe nicht oder nur sehr viel weniger störend auswirken als bei der diskontinuierlichen Elektrophorese auf Filtrierpapierstreifen[12]. Nur dann, wenn die Adsorption irreversibel ist oder wenn Substanzgemische mit extrem hohen Teilchengrößen, also etwa Viren, gelöste Faserproteine, Suspensionen von Bakterien oder Zellen getrennt werden sollen, ist die Anwendung poröser Träger nicht oder zumindest nur sehr begrenzt möglich.

Es war daher naheliegend, das kontinuierliche elektrophoretische Trennverfahren auch ohne Anwendung eines Trägermaterials, also in homogener Lösung, durchzuführen, um den Anwendungsbereich dieser vielseitigen Methode zu erweitern.

So berichteten Dobry u. Finn 1958[3] über eine Anordnung der trägerfreien kontinuierlichen Elektrophorese.

In einem etwa 120 cm langen Rohr mit rechteckigem Querschnitt (5 × 8 cm), an dessen beiden Schmalseiten die Elektrodenkammern über eine semipermeable Wand angeschlossen sind, wird das Transportmedium, z. B. eine Pufferlösung, in verhältnismäßig rascher Strömung laminar von unten nach oben bewegt. Die Zuführung des zu trennenden Substanzgemisches erfolgt unten zentral über einen 40 mm langen und 2 mm breiten Schlitz. Während des Durchströmens des verhältnismäßig hohen elektrischen Feldes werden die einzelnen Komponenten getrennt und können durch Capillarschlitze am anderen Ende der Röhre entnommen werden.

Man wird in dieser Anordnung wegen des geringen Ablenkungswinkels keine sehr große Trennschärfe erwarten können, dagegen erscheint das Verfahren vielversprechend bei der Trennung von Zweikomponentengemischen.

Der Trennung in zwei Fraktionen, z. B. in eine anodisch und eine kathodisch wandernde Komponente, dient eine Apparatur von Bier[2], die sehr hohe Mengendurchsätze erlaubt. Die Anordnung stellt eine Kombination aus den bekannten Verfahren der Elektrokonvektion und der freien Durchflußelektrophorese dar.

Für die Auftrennung eines Vielkomponentengemisches scheint dagegen im Prinzip die von Barrollier, Watzke u. Gibian[1] zuerst beschriebene Anordnung besser geeignet zu sein.

Zwischen zwei gekühlten, nur schwach geneigten Glasplatten (60 × 60 cm), die in einem Abstand von 0,5 mm angeordnet sind, wird – durch Zellstoffstreifen zugeleitet – eine geeignete Pufferlösung in Form eines 0,5 mm dicken Filmes bewegt. Seitlich angebrachte Elektroden, die ständig mit Pufferlösung umspült

werden, vermitteln über Papierfiltrierstreifen elektrischen Kontakt mit dem Pufferfilm, so daß quer zu der Strömung der Pufferlösung ein elektrisches Feld liegt. Das Substanzgemisch wird an einer Stelle mittels einer Capillare kontinuierlich zugeführt. Die Entnahme der Fraktionen erfolgt über eine Anzahl schmaler Streifen aus Zellstoff, die an dem gegenüber der Pufferzuführung liegenden Plattenrand 1—2 cm in den Flüssigkeitsfilm hineinragen. Die Abführung der Jouleschen Wärme erfolgt in dieser Anordnung mittels Kühlsohle durch die als Kühlkammern ausgebildeten Glasplatten.

Wir beschäftigen uns ebenfalls bereits seit einigen Jahren mit der Entwicklung einer ähnlichen trägerfreien kontinuierlichen Elektrophoreseanordnung und sind mit den Problemen und Schwierigkeiten, die sich dabei ergeben, sehr vertraut geworden.

Aus unseren Erfahrungen können wir folgern, daß die Verwendung von Dochten oder saugfähigen Streifen zur Entnahme der Fraktionen aus zweierlei Gründen ungeeignet ist:

Erstens wird der Verwendungszweck der Anordnung stark eingeschränkt (Adsorption, Teilchengröße, siehe oben) und zweitens wird im kontinuierlichen Betrieb eine Gleichförmigkeit der Strömung des nicht stabilisierten Pufferfilms in der Trennregion als Folge ungleichmäßigen Abtropfens aus den Dochten niemals erreicht werden können.

Wie rasch die einzelnen Streifen saugen, hängt außer von ihrer Form auch von manchen anderen überhaupt nicht konstant zu haltenden Faktoren ab, wie Verklebung oder Verstopfung durch Adsorption, Oberflächenspannung usw. Als Folge resultieren Trennungschärfen und Vermischungen der an sich in der Anordnung getrennten Komponenten durch die Entnahmevorrichtung selbst.

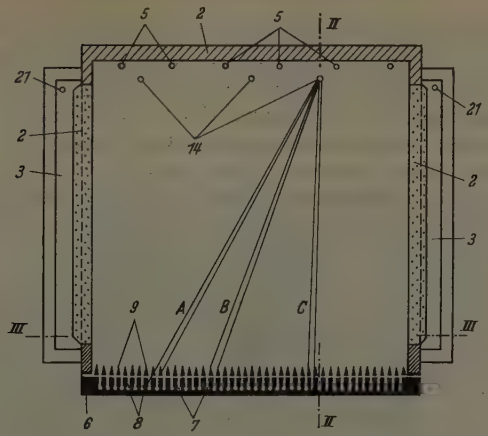
Auch bereitet die Aufrechterhaltung eines gleichen Plattenabstandes (vgl. dazu auch Hölzer u. Mitarb.[9]) und damit eines konstanten elektrischen Feldes sowie gleichförmiger Strömungsverhältnisse durch die Verwendung mit Flüssigkeit gekühlter Glasplatten wegen der Durchbiegungsgefahr große Schwierigkeiten.

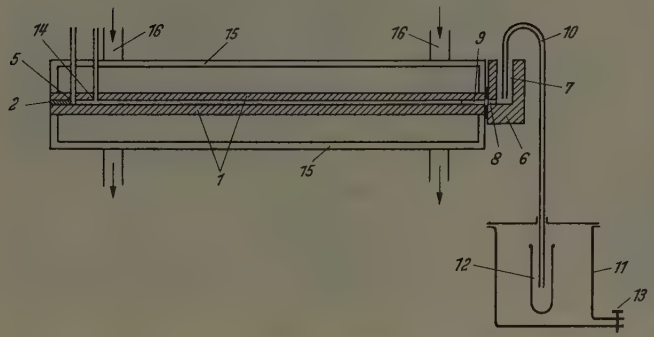
In Erkenntnis dieser methodischen und apparativen Fehlermöglichkeiten haben wir bei der Entwicklung unserer Apparatur einen Weg beschritten, der den erforderlichen Voraussetzungen für eine einwandfreie Funktion der Anordnung Rechnung trägt.

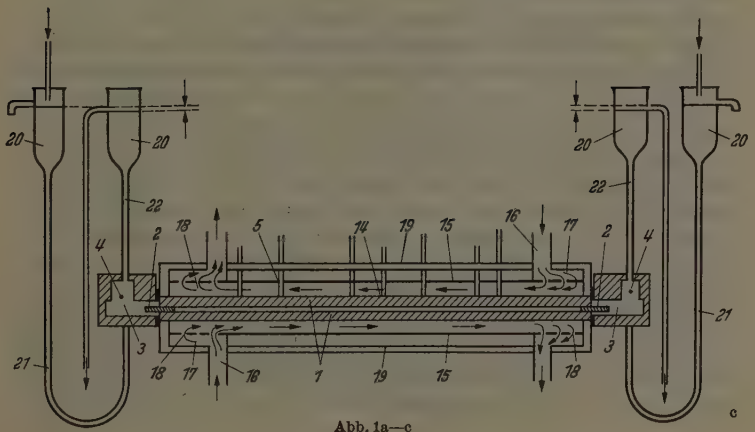
Beschreibung der Apparatur

Die Gleichförmigkeit der Strömung des Pufferfilms sowie die Aufrechterhaltung eines homogenen elektrischen Feldes innerhalb der von den

Abb. 1 a—c. *Schemazeichnung der Trennkammer.* a Ansicht von oben (vorn); b Schnitt *II—II*; c Schnitt *III—III*. *1* Glasplatten (50 × 50 cm); *2* U-förmiger Filtrierkartonstreifen (an den schraffierten Stellen paraffiniert); *3* Elektrodenräume; *4* Platinelektroden; *5* Bohrungen durch die obere Glasplatte zur Pufferzuführung; *6* Entnahmevorrichtung; *7* Bohrungen (8 mm ⌀; 30 mm tief); *8* Bohrungen senkrecht zu *7* (3 mm ⌀); *9* Stege; *10* Absaugröhrchen; *11* geschlossener Behälter; *12* Auffanggläser (50 Stück); *13* Magnetventil; *14* Bohrungen durch die obere Glasplatte für die Zuführung der zu trennenden Substanzgemische; *15* Kühlmäntel; *16* Kühlluft-zuführung; *17* Kühlluftverteilerrohr; *18* Bohrungen durch *17*; *19* Isolationsmantel; *20* Niveaugefäße; *21* Zu- und *22* Abführung der Elektrodenspülflüssigkeit; *A*, *B*, *C* Wanderungswege dreier Komponenten


5
2
5
II
27
21
2
14
3
2
3
9
A
B
C
III
III
6
8
7
II


14
16
15
16
9
10
5
7
2
8
6
1
15
12
11
13


20
20
20
20
22
22
4
2
18
5
14
19
15
16
17
2
4
3
3
21
27
18
17
18
1
19
15
18

c

Abb. 1a—c

beiden Glasplatten (50×50 cm) und einem U-förmigen Filtrierpapierstreifen von 0,5—1 mm Stärke gebildeten schmalen Küvette wird durch 3 Maßnahmen gewährleistet (Abb. 1a, b, c):

1. Die Zuführung der Pufferlösung erfolgt zwangsläufig und vollkommen gleichförmig durch *6* entsprechend verteilte Bohrungen (*5*) entlang des Randes der oberen Glasplatte mittels einer 6fachen Schlauchpumpe. Die Menge der Pufferzuführung und damit die Strömungsgeschwindigkeit innerhalb der Trennkammer ist dabei kontinuierlich in praktisch beliebigen Grenzen variierbar.

2. Die Entnahme der Fraktionen geschieht ohne Zwischenschalten von Dochten in freier Strömung ebenfalls zwangsweise völlig gleichmäßig durch eine Entnahmevorrichtung (*6*), die im Prinzip eine Vielzahl kleiner kommunizierender Gefäße darstellt. Sie besteht aus einer Leiste aus Kunststoff mit 50 Bohrungen (*7*) (8 mm ⌀) und der gleichen Anzahl dazu senkrecht geführter Bohrungen (*8*) von 3 mm ⌀. Mit den kleineren Bohrungen wird über eine Dichtung aus Gummi die Entnahmevorrichtung an die Plattenränder dicht aufgepreßt, so daß die zwischen den beiden Glasplatten strömende Elektrolytlösung in die kleineren Bohrungen eintreten und die Gefäße (*7*), gebildet aus den größeren Bohrungen, füllen kann. Zwischen den beiden Glasplatten an der Entnahmestelle sind zur genauen Einhaltung des Plattenabstandes kleine Stege (*9*) zwischen den Bohrungen angebracht. Da die kleinen Gefäße untereinander in kommunizierender Verbindung stehen, müssen sie (wenn die Entnahmeleiste genau horizontal liegt) zwangsläufig gleich hoch und mit gleichem Volumen entsprechend der Strömungsgeschwindigkeit der Pufferlösung gefüllt werden. Damit ist die Voraussetzung einer vollkommen gleichmäßigen Strömung innerhalb des Trennraums zwangsläufig gegeben. Um einen kontinuierlichen Betrieb aufrechtzuerhalten, müssen noch die kleinen Gefäße, wenn sie fast bis zum Rand gefüllt sind, rasch und gleichmäßig entleert werden können. Dies geschieht durch eine Absaugvorrichtung aus Capillarröhrchen (*10*), die in ein geschlossenes Gefäß (*11*) münden, in denen sich 50 Auffanggläser (*12*) von geeignetem Volumen befinden, in deren Öffnungen die Enden der Entnahmeröhrchen (*10*) münden. Wenn die Auffanggefäße (*8*) in der Entnahmevorrichtung gefüllt sind, wird, gesteuert durch eine Zeitschaltuhr, über ein Magnetventil (*13*) kurzzeitig das Gefäß (*11*) evakuiert. Die kleinen Entnahmegefäße werden auf diese Weise schnell geleert. Schließlich wird Luft nachgesaugt und dadurch eine Heberwirkung der dünnen Capillaren aufgehoben. Dieser Vorgang wiederholt sich beliebig oft.

3. Die Kühlung der Glasplatten erfolgt im Gegensatz zur Anordnung von Barrollier u. a. durch Beströmen der Glasplatten mit gekühlter Luft von — 10 bis — 35° C. Dadurch wird ein Durchbiegen der Platten weitgehend vermieden und ein homogenes elektrisches Feld aufrechterhalten.

Der Vorschlag von Hölzer u. a.[9], zur Aufrechterhaltung eines gleichen Plattenabstandes zusätzlich an geeigneten Stellen kleine runde Scheibchen beizulegen, hat sich auch in unserer Anordnung bewährt. Die Kühlmäntel (*15*) aus Kunststoff werden auf die beiden Glasplatten gepreßt, die über die Luftzuführstutzen (*16*) durch ein Verteilungsrohr (*17*)

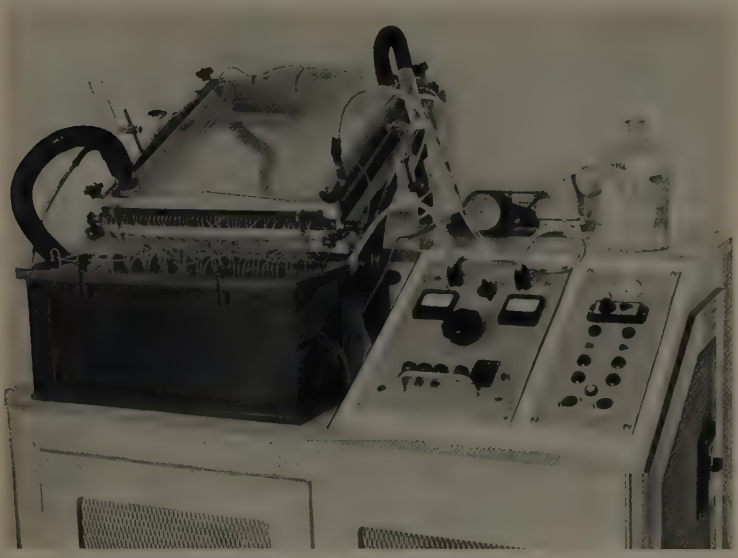


Abb. 2. *Trennapparatur in der Gesamtansicht*

mit Bohrungen (*18*) die Kühlluft gleichmäßig auf die Platten verteilen. Zur Isolation ist ein weiterer Mantel (*19*) über dem eigentlichen Kühlmantel angebracht.

Das zu trennende Substanzgemisch wird durch eine der vorgesehenen Öffnungen (*14*) der Trennregion mittels einer Dosiervorrichtung zugeführt. Zur Vermeidung des unerwünschten Ein- und Ausströmens von Pufferlösung in die Trennregion aus den durchströmten Elektrodenräumen und umgekehrt [über die Filtrierpapierstreifen (*2*)] müssen die Druckverhältnisse in den Elektrodenräumen denen in dem Trennraum angepaßt sein. Dies wird erreicht durch entsprechend angebrachte Niveaugefäße (*20*) an der Zu- und Abführung (*21* u. *22*) der Elektrodenspülflüssigkeit. Durch geeignete Einstellung der Niveaugefäße kann man darüber hinaus eine Querströmung des Pufferfilms z. B. zur Kompensation elektroosmotischer Strömungen erreichen.

Die Vermeidung von Dochten sowohl für die Pufferzuführung als auch für die Entnahme der Fraktionen, zusammen mit der Möglichkeit einer Druckregelung über die geschlossenen Elektrodenräume, erlaubt es, die Trennkammer wahlweise in beliebig einstellbarer Neigung anzuordnen. Eine Neigung nach oben, derart, daß die Entnahmevorrichtung höher liegt als die Zuführstellen der Transportflüssigkeit (Puffer), erleichtert wesentlich das sonst sehr schwierige blasenfreie Füllen der

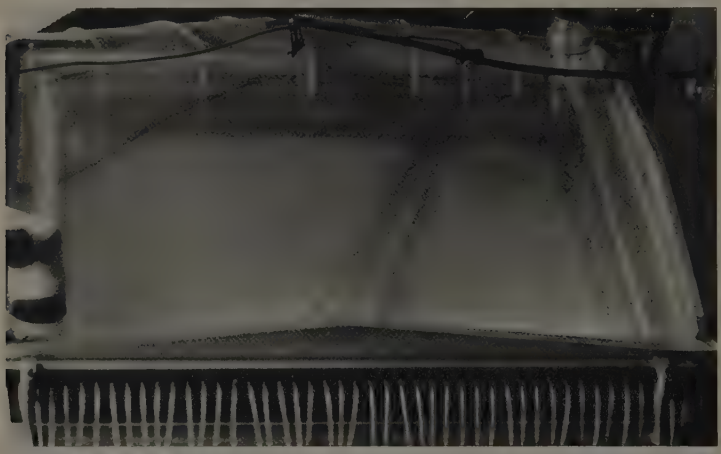


Abb. 3. *Farbstofftrennung.* Synthetische Mischung aus gleichen Teilen von: Bromphenolblau, Bromkresolgrün, Kresolrot, Säurefuchsin und Kresolpurpur. (Pyridin-Essigsäurepuffer p_H 4,9; 1800 Volt, 120 Milliamp.; Durchlaufgeschwindigkeit der Pufferlösung: 0,9 cm/min)

schmalen Kammer. Dagegen ist die entgegengesetzte Neigung (um 45° und mehr) in vielen Fällen zur Erhöhung der Trennschärfe zweckmäßig und oft unerläßlich (vgl. dazu Trennbeispiel 5).

Abb. 2 zeigt die Gesamtansicht der Apparatur in unserem Laboratorium.

Trennbeispiele

1. Farbstofftrennung. Zur Testung der Apparatur eignet sich am besten ein Gemisch aus Farbstoffen, da hierbei die Wanderungswege durch die Trennapparatur deutlich sichtbar werden. Im Beispiel der Abb. 3 wird die Trennung eines Gemisches aus gleichen Teilen von Bromphenolblau, Bromkresolgrün, Kresolrot, Säurefuchsin und Kresolpurpur bei Verwendung eines Essigsäure-Pyridinpuffers vom p_H 4,9 veranschaulicht. Die angelegte Spannung betrug 1800 V, wobei ein Strom von 120 Milliamp. floß. Die Trennwege zeichnen sich durch eine besondere Schärfe und eine sehr gute Geradlinigkeit aus, was die gleichförmigen Strömungsverhältnisse innerhalb der Trennregion beweist.

2. Aminosäuretrennung. In Abb. 4 wird das Ergebnis einer Aminosäuretrennung (Eiweißhydrolysat) nach Austestung der Ninhydrinfärbung in den Auffanggläschen

veranschaulicht (Pyridin-Essigsäurepuffer p_H 3,9 1500 V, 150 Milliamp.). Die Durchsatzleistung betrug 60 mg Aminosäuregemisch je Stunde. Die ausgezeichnete Trennschärfe ließe noch einen bedeutend größeren Mengendurchsatz für die Gruppentrennung der Aminosäuren zu.

3. Auftrennung von Abbaupeptiden. Zur Auftrennung von Abbaupeptiden, die durch enzymatische Spaltung von Collagen mit kristallisiertem Trypsin erhalten worden waren, wurde ein Pyridin-Eisessigpuffer vom p_H 4,9 verwendet (1800 V, 130 Milliamp.). Die Durchsatzleistung betrug 80 mg Abbaugemisch je Stunde; es wurden so innerhalb von 10 Tagen 19 g in kontinuierlicher Arbeitsweise aufgetrennt. Die Verteilung der in den Auffangläschen gesammelten Fraktionen wurde täglich mittels Ninhydrinfärbung nach Hydrolyse getestet. Abb. 5 zeigt die graphische

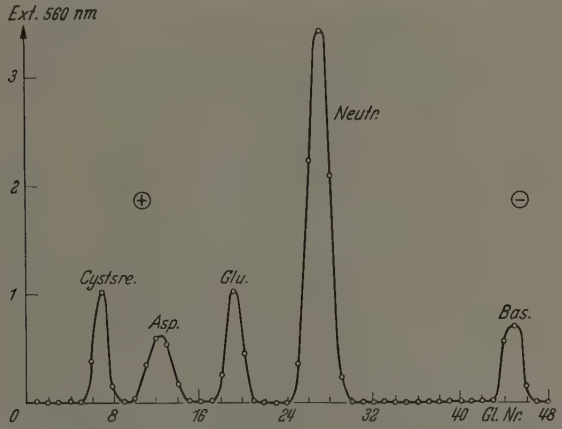


Abb. 4. *Gruppentrennung eines Aminosäuregemisches*, Verteilungskurve der Ninhydrinanfärbung in den Auffangläschen. (Pyridin-Essigsäurepuffer p_H 3,9; 1500 Volt, 150 mA; Durchlaufgeschwindigkeit: 0,8 cm/min; Durchsatz: 60 mg Aminosäuregemisch/Std)

Auswertung der Meßergebnisse. Während der gesamten Versuchsdauer blieb die Verteilung vollkommen konstant, die einzelnen Fraktionen konnten täglich ihren gleichen zugehörigen Auffangläschen entnommen werden.

4. Serumtrennungen. Für die Auftrennung der Serumproteine wurde ein Veronalpuffer vom p_H 8,6 und der Ionenstärke 0,05 gewählt. Die angelegte Spannung betrug bis zu 2000 V (das sind 40 V/cm), wobei ein Strom von 180 Milliamp. floß. Die Durchlaufzeit des Pufferfilms durch die Trennapparatur betrug in diesen Versuchen etwa 75 min. Das Spektrum der aufgetrennten Serumproteine, ermittelt durch Extinktionsmessung bei 280 nm (Abb. 6), erstreckte sich auf 38 cm. Es konnten so bis zu 40 ml Serum je Tag, das sind etwa 3 g Protein, bei guter Trennschärfe aufgetrennt werden. In fast allen Fällen konnte die vor dem Albumin laufende sogenannte Präalbuminfraktion deutlich abgetrennt werden. Beachtlich ist auch die gute Auftrennung der β-Fraktion in β_1 und β_2.

5. Auftrennung einer Mischung von Kaninchen- und Humanerythrocyten. Als Beispiel für die Eignung der kontinuierlichen freien Elektrophoreseanordnung zur Auftrennung von Substanzgemischen mit großer Teilchengröße wurden gewaschene Kaninchen- und Humanerythrocyten in isotonischer Lösung bei p_H 7,2 in Phosphatpuffer mit Glucosezusatz getrennt. Bei diesem Versuch war die Trennkammer um

etwa 45° nach unten geneigt, um ein Sedimentieren der Erythrocyten auf die untere Glasplatte zu vermeiden.

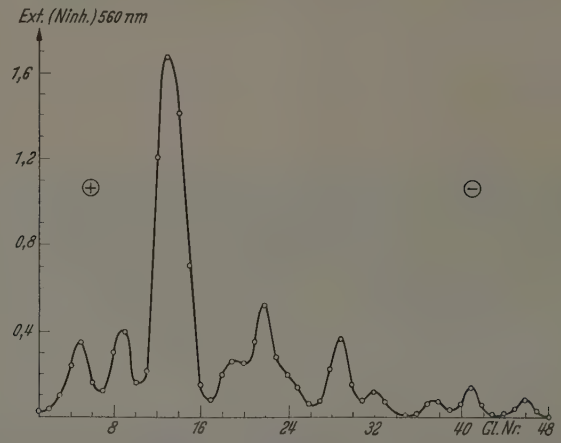


Abb. 5. *Auftrennung von Abbaupeptiden.* Verteilungskurve der Ninhydrinfärbung nach Hydrolyse (Pyridin-Essigsäurepuffer p_H 4,9; 1800 Volt. 130 Milliamp.; Durchlaufgeschwindigkeit: 0,65 cm/min, Durchsatz: 80 mg Abbaugemisch/Std)

In Abb. 7 sind die Wanderungswege der beiden Komponenten während des Versuches photographisch festgehalten worden. Dieser Versuch beweist, daß es gelingt, auch solche Substanzgemische, die für die Trägerelektrophorese nicht zugänglich sind, aufzutrennen.

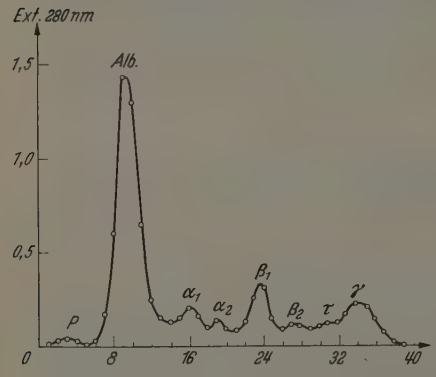


Abb. 6. *Beispiel einer Serumtrennung.* Eiweißverteilungskurve erhalten durch Messung der Extinktion bei 280 nm (Veronalpuffer p_H 8,6, μ 0,05; 1500 Volt, 150 Milliamp.; Durchlaufgeschwindigkeit: 0,40 cm/min; Durchsatz: 23 ml Serum/Tag)

Die Durchsatzleistung in der beschriebenen freien kontinuierlichen Elektrophoreseanordnung erreichte bisher noch nicht diejenige der Filtrierkartonelektrophorese[7,8], bei der als Trägermaterial bedeutend dickere Schichtträger verwendet werden. Versuche zur Erhöhung der Durchsatzleistung auch in der freien Anordnung zeigten, daß eine Erweiterung des Plattenabstandes und damit die Möglichkeit zum Durchsatz größerer Puffer- und Substanzmengen unter bestimmten Bedingungen durchaus möglich ist. Wenn die beiden Glasplatten mit ihrer zur

Trennregion zugekehrten Seite siliconisiert wurden, konnte ein Plattenabstand von 1 mm bei guter Trennschärfe eingehalten werden.

Eine Erweiterung des Plattenabstandes über dieses Maß hinaus läßt sich bei gleichbleibender Trennschärfe dann erreichen, wenn die strömende Pufferlösung ungefähr dasselbe spezifische Gewicht wie die Lösung der zu trennenden Substanz besitzt. Man kann z.B. die Transportflüssigkeit durch Zumischung von spezifisch schweren, löslichen Substanzen, die nicht oder nur wenig elektrisch leitend sind (z.B. Zuckerlösungen), dem spezifischen Gewicht der zu trennenden Substanz

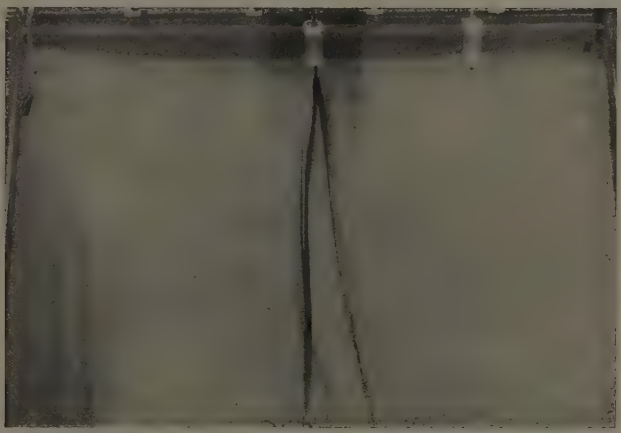


Abb. 7. *Trennung einer Mischung von Kaninchen- und Humanerythrocyten.* Photographie der Wanderungswege während des Versuches. (0,25 m Na-Phosphatpuffer p_H 7,2 + 5,4%ige Glucoselösung (1:5; isotonisch); 2000 Volt, 180 Milliamp.; Durchlaufgeschwindigkeit: 2,5 cm/min)

anpassen. Wir haben auf diese Weise noch ausgezeichnete Trennschärfen bei Plattenabständen von 2 mm und mehr erhalten, wenn die Trennkammer gleichzeitig stark schräg gestellt wurde.

Im ganzen gesehen wird die freie kontinuierliche Elektrophorese wohl die häufigste Anwendung bei der Auftrennung sehr hochmolekularer und von Trägermaterialien sehr leicht adsorbierbarer Naturstoffe erfahren; sie stellt somit eine gute Ergänzung zu den elektrophoretischen Trennverfahren in heterogenen Systemen dar.

Literatur

[1] Barrollier, J., E. Watzke u. H. Gibian: Z. Naturforsch. **13** b, 754 (1958). — [2] Bier, M.: Science (Lancaster, Pa.) **125**, 1084 (1957). — [3] Dobry, R., u. R. Finn: Science (Lancaster, Pa.) **127**, 697 (1958). — [4] Grassmann, W., u. K. Hannig: DBP 805399 vom 24. 5. 1949. — Grassmann, W.: Vortrag auf der Tagung der Physiologen und physiol. Chemiker in Göttingen am 31. 8. 1949; Angew. Chem. **62**,

170 (1950); Ber. ges. Physiol. exp. Pharmakol. **139**, 220 (1950); Naturwissenschaften **38**, 200 (1951). — [5] Grassmann, W., u. K. Hannig: Naturwissenschaften **37**, 397 (1950); Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **292**, 32 (1952). — [6] Grassmann, W., u. K. Hannig: Präparative Elektrophorese, in Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, 4. Aufl., Bd. I/1, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1958, S. 685. — [7] Grassmann, W., K. Hannig u. M. Schleyer: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **322**, 71 (1960). — [8] K. Hannig: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **311**, 63 (1958); vgl. diese Z. **168**, 42 (1959). — [9] Hölzer, K. H., B. Noack u. K. Wiek: Klin. Wschr. **38**, 502 (1960). — [10] Svensson, H., u. I. Brattsten: Ark. Kemi **1**, 401 (1949). — [11] Tiselius, A.: Nova Acta Regiae Soc. Sci. Upsaliensis **7**, 4 (1930); Trans. Faraday Soc. **33**, 524 (1927); Kolloid-Z. **85**, 129 (1938); Naturwissenschaften **37**, 25 (1950). — [12] Weber, R.: Helv. chim. Acta **36**, 424 (1953).

Dr. K. Hannig, Max Planck-Institut für Eiweiß- u. Lederforschung, München 15, Schillerstr. 46

---

2. Trennung durch Phasengleichgewichte ohne Hilfsphase

Institut für Organische Chemie der Universität Erlangen

Normales Erstarren, Zonenschmelzen und Kolonnenkristallisieren

Neue Methoden des fraktionierten Kristallisierens aus der Schmelze

Von

H. Schildknecht

Mit 30 Textabbildungen

(Eingegangen am 27. Oktober 1960)

So sehr wir uns oft heute noch mit mehr oder minder unreinen Stoffen, den Endprodukten einer Synthese oder einer Naturstoffaufarbeitung, abfinden müssen, so bleibt doch das Bestreben des Chemikers, die Substanzen frei von Verunreinigungen darzustellen. Der Beweggrund hierfür braucht nicht allemal nur der Ehrgeiz zu sein, die reinste Verbindung in Händen zu haben; nicht selten kann man eben nur an sehr reinen Substanzen die wahren chemischen und physikalisch chemischen Eigenschaften studieren.

Kristallinen Verbindungen schreibt man schon seit jeher besondere Reinheit zu und schließt im Geiste vom ebenen Äußeren der Kristallflächen auf einen einheitlichen inneren Bau. Schon zu Zeiten der Alchemisten und sehr wahrscheinlich noch früher hat gerade die Kristallisation zur einfachen, aber effektvollen Reinigung von Stoffen gedient, in der Erkenntnis oder in der Ahnung, daß dem Kristall besondere Kräfte innewohnen und daß das Kristallwerden verbunden ist mit einer Läuterung der Materie. Seit diesen Tagen reinigt der Metallurge durch Schmelzen und Erstarren, während man in der organischen Chemie bevorzugt

aus Lösungen umkristallisiert und somit von vorneherein auf eine besondere Reinheit des Kristallisates verzichtet. Denn das Lösungsmittel ist immer ein Fremdkörper und kann vermieden werden, wenn man die flüssigen oder verflüssigten Verbindungen selbst fraktioniert kristallisiert. Die üblichen Verfahren der fraktionierten Kristallisation sind jedoch umständlich und zeitraubend. Hier brachten die neueren Methoden, das „Normale Erstarren", das Zonenschmelzen und Kolonnenkristallisieren eine wesentliche Vereinfachung.

Theorie

Grundlage und Bedingung der auf dem Zweiphasensystem fest-flüssig beruhenden Trenn- und Reinigungsverfahren ist, daß die im Gleichgewicht befindlichen Phasen Unterschiede in ihrer Zusammensetzung aufweisen. Am deutlichsten ist dies der Fall, wenn sich aus einer flüssigen Mischung beim Kristallisieren zuerst ein reiner Stoff abscheidet. Dieses Erstarrungsverhalten einer Mischphase wird quantitativ und qualitativ z. B. durch das in Abb. 1 gezeigte Zustandsdiagramm beschrieben[4].

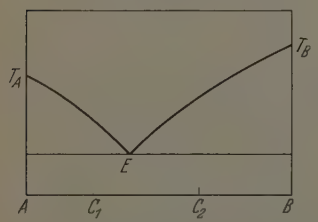


Abb. 1

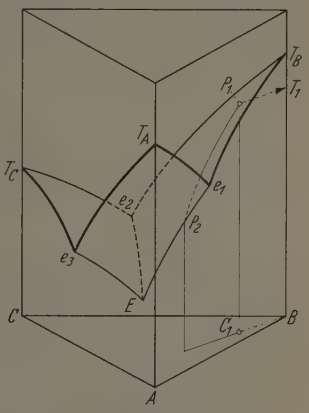


Abb. 2

Abb. 1. Zweiphasendiagramm im festen Zustand nicht mischbarer Stoffe A und B
Abb. 2. Zweiphasendiagramm im festen Zustand nicht mischbarer Stoffe A, B und C

Kühlt man die Schmelze des Stoffgemisches A, B mit der Zusammensetzung C_1 langsam auf eine Temperatur ab, die etwas unterhalb dem Schnitt der Vertikalen durch C_1 mit der Liquiduskurve $T_A\,E$ liegt, dann kommt es zunächst zur Abscheidung von A. Geht man von C_2 aus, dann scheidet sich reines B ab. Auch beim weiteren Abkühlen wird das solange der Fall sein bis die Schmelze die Zusammensetzung E aufweist und ein mikrokristallines Gemenge aus A und B auskristallisiert.

Nicht viel komplizierter liegen die Verhältnisse bei Mehrstoffsystemen, von denen hier nur ein solches mit drei Komponenten A, B und C — die untereinander eutektische Systeme bilden können — erwähnt werden soll (Abb. 2).

Dieses Mal sind es nicht mehr Kurven, sondern Flächen ($T_A\, e_1 E e_3$, $T_B\, e_2 E e_1$ und $T_C\, e_3 E e_2$), die alle ternären Zusammensetzungen der Schmelzen angeben und die bei den entsprechenden Temperaturen mit einem der drei reinen Stoffe im Gleichgewicht stehen. Je nach Lage der Ausgangskonzentration werden diese beim Abkühlen zuerst erscheinen: für C_1 zunächst reines B, bis die Zusammensetzung der Schmelze entlang des Kurvenzuges $P_1 P_2$ den Punkt P_2 erreicht hat, bei dem sie mit einem festen Gemisch von A und B im Gleichgewicht auftritt. Das binäre Gemisch wird solange auskristallisieren bis die ternäre eutektische Zusammensetzung bei E erreicht ist.

Ganz entsprechend verhalten sich Gemische anderer Konzentrationen. Unter der Voraussetzung, daß keine der verschiedenen Mischungen eine Zusammensetzung aufweist, die einem Punkt auf den eutektischen Kurven oder dem Eutektikum E entspricht, kann man sechs verschiedene Abscheidungsfolgen unterscheiden:

$$
\begin{array}{l}
A - A \text{ und } B - E \\
A - A \text{ und } C - E \\
B - A \text{ und } B - E \\
B - B \text{ und } C - E \\
C - A \text{ und } C - E \\
C - B \text{ und } C - E
\end{array}
$$

Würde man vor dem Auskristallisieren der eutektischen Gemische — und das gilt nicht nur für die beschriebenen einfachen Systeme — die Kristalle der reinen Stoffe isolieren, so wäre damit der erste Schritt einer Stofftrennung gegeben. Am einfachsten und übersichtlichsten gelingt dies durch ein gerichtetes Erstarren der flüssigen Mischung, oder wie man solch einen Vorgang auch nennt durch „Normales Erstarren". Dazu wird ein mit flüssiger Substanz gefülltes Reagensglas langsam — z. B. 5—50 cm in der Stunde — in ein gekühltes Rohr gesenkt (Abb. 3)[15].

Verhindert man eine übereilte Konzentrationserhöhung der sich in der Flüssigkeit anreichernden Substanzen an der Phasengrenzschicht durch gute Durchmischung der gesamten flüssigen Phase, so genügt für die Aufteilung des Gemisches in reine Stoffe und Eutektika bereits ein Arbeitsgang.

In der erstarrten Substanz liegt ein Konzentrationsverlauf vor, der durch das Gleichgewichtsverhalten der Stoffgemische an der Phasengrenze bestimmt ist. Systeme, die Mischkristalle bilden können, verhalten sich deswegen anders als die eben beschriebenen. Wie man einem dafür geltenden Phasendiagramm der Abb. 4 entnehmen kann, ist hier das Kristallisat auch eine Lösung, die aber anders zusammengesetzt ist, als die anliegende, flüssige Phase.

Jede zwischen den Schmelzpunkten der reinen Substanzen (T_A und T_B) gelegene Isotherme gibt in ihren Schnittpunkten mit Liquidus- und Soliduskurve die Zusammensetzung der bei dieser Temperatur miteinander im Gleichgewicht befindlichen Schmelze und Mischkristalle an. Angenommen, es wird eine Lösung der Zusammensetzung C_0 auf die Temperatur T_1 abgekühlt, dann haben die zuerst erscheinenden Kristalle die Zusammensetzung C_1 und die Lösung verarmt an B. Wird das Erstkristallisat entfernt und die Temperatur weiterhin schwach erniedrigt, so sind die neuen Kristalle wieder reicher an dem höher schmelzenden Stoff B als die verbleibende Lösung, so daß die Konzentration für A in

Abb. 3

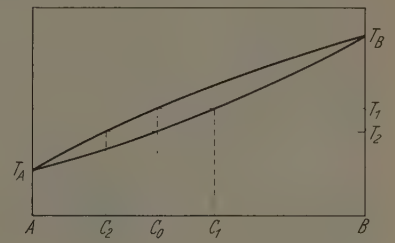


Abb. 4

Abb. 3. Schematische Darstellung des „Normalen Erstarrens" am Anfang (1), während (2) und am Ende (3) des Erstarrungsvorganges. S Substanzrohr, R Rührer, K Kühlrohr

Abb. 4. Phasendiagramm für Mischkristalle des Typus I nach Roozeboom[4]

der flüssigen Phase erneut zunimmt. Einmal wird es in der Folge solcher Operationen auch dazu kommen, daß die Kristalle die gleiche Zusammensetzung haben wie die Ausgangslösung. Dies ist auch beim Normalen Erstarren der Fall, wo ebenfalls die Zusammensetzung der Flüssigkeit der Liquiduskurve und die der Mischkristalle der Soliduskurve folgt, da die Schmelze nur mit den gerade abgeschiedenen Kristallen im Gleichgewicht steht. Es werden also verschieden zusammengesetzte Kristallpartien hintereinander abgeschieden, ohne daß sich diese mit der Restschmelze erneut ins Gleichgewicht setzen können, da jede neu gebildete Kristallschicht die kurz vorher gebildete vor Benetzung mit der Lösung schützt. Diese Tatsache ist ganz besonders wichtig für das Zustandekommen eines Trenneffektes beim Normalen Erstarren und, wie wir noch sehen werden, auch beim Zonenschmelzen. So findet also schon beim Normalen Erstarren einer flüssigen Mischphase eine teilweise Entmischung statt, indem im zuerst erstarrten Teil die Komponente B angereichert ist und im zuletzt erstarrenden Teil Stoff A vorherrscht.

Voraussetzung ist allerdings, daß die Erstarrungsgeschwindigkeit größer ist als die Diffusionsgeschwindigkeit in der festen Phase.

Der nach dem Erstarren resultierende Konzentrationsverlauf ist nach Gl. 1 berechenbar[5,6,8,9,12]:

$$C = C_0 \cdot K. \quad (1 - g)^{K-1} . \tag{1}$$

C ist die Konzentration im Festkörper, wenn der Bruchteil g des ursprünglichen Volumens erstarrt ist, C_0 die Ausgangskonzentration der homogenen Lösung und K der Verteilungskoeffizient, der als Ruhewert aus dem Zustandsdiagramm entnommen werden kann. K, das Verhältnis der Konzentrationen z. B. des Stoffes A im Kristallisat und in der flüssigen Lösung, ist:

$$K_A = \frac{C_{A,\,\text{fest}}}{C_{A,\,\text{flüssig}}} . \tag{2}$$

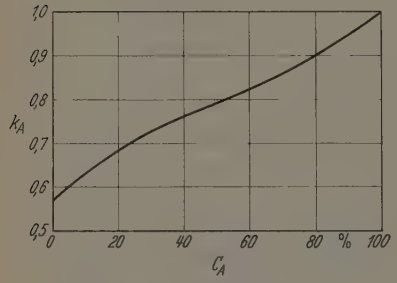


Abb. 5

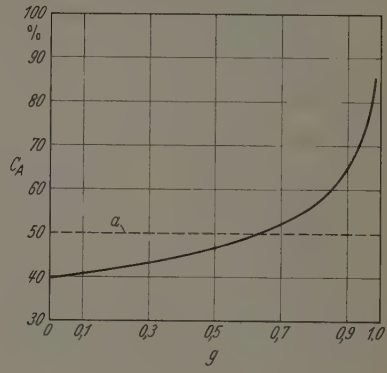


Abb. 6

Abb. 5. Abhängigkeit des Verteilungskoeffizienten K von der Konzentration von $C_{A,\,\text{flüssig}}$

Abb. 6. Konzentrationsverlauf eines Stoffes A in einem normal erstarrten Stab. g erstarrter Bruchteil, a Ausgangskonzentration $C_0 = 50\%\ A$

Der Verteilungskoeffizient variiert für das gleiche Stoffsystem mit der Konzentration was durch Abb. 5 veranschaulicht werden soll. Die K-Werte der Substanz A sind einem fiktiven Schmelzdiagramm der Art, wie Abb. 4 es zeigt, entnommen: sie variieren also beträchtlich und ihre Konstanz ist nur in stark verdünnten Lösungen zu erwarten.

Unter Verwendung der Verteilungskoeffizienten von Abb. 5 kann man den Konzentrationsverlauf für A entlang eines erstarrten Stabes nach HAMMING[10] berechnen. Der in Abb. 6 wiedergegebenen Konzentrationskurve liegt eine Ausgangskonzentration $C_0 = 50\%\ A$ zugrunde.

Nun darf man aber nicht vergessen, daß der Verteilungskoeffizient auch von den Erstarrungsbedingungen beeinflußt wird und man deswegen von einem effektiven Wert K_{eff} spricht. Man berücksichtigt damit, daß sich z. B. Substanzen mit $K < 1$ vor der Phasengrenze solange an-

sammeln, bis der Abgang aus der Phasengrenzschicht durch Diffusion, Konvektion und Einbau in die Kristalle gleich dem Zulauf aus dem Innern der flüssigen Phase ist. In der Diffusionsschicht selbst, die unmittelbar an die feste Phase grenzt, erfolgt der Stofftransport im Gegensatz zur übrigen flüssigen Phase lediglich durch Diffusion. Die Dicke der Phasengrenzschicht wird mit δ bezeichnet; sie ist besonders abhängig von den Strömungsverhältnissen in der vorgelagerten Flüssigkeit und von ihrer Viscosität. Wieweit der Verteilungskoeffizient von der Kinetik des Erstarrungsvorganges beeinflußt wird, kann man der Gl. 3 von Burton, Prim u. Slichter[3] entnehmen, womit K_{eff} und der Ruhewert K in Beziehung gesetzt wird:

$$K_{\text{eff}} = \frac{K}{K + (1 - K)\, e^{-f \cdot \delta / D}} \cdot \quad (3)$$

In ungünstigen Fällen, vor allem wenn die flüssige Phase nicht ausreichend durchmischt wird, kann $K_{\text{eff}} = 1$ werden. Das heißt, daß die sich abscheidenden Kristalle die gleiche Zusammensetzung wie die Flüssigkeit haben und eine Trennung hinfällig geworden ist. Diese Tatsache muß man besonders berücksichtigen, wenn man aus technischen Gründen die mit den Kristallen im Gleichgewicht stehende Schmelze oder Lösung mechanisch nicht durchmischen kann.

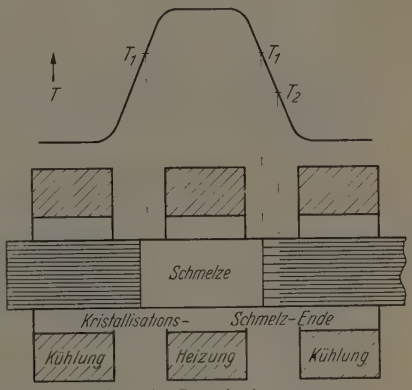


Abb. 7. Schematische Darstellung einer Schmelzzone in einem Kristallbarren

Das ist der Fall beim Zonenschmelzen, wo nur ein Teil eines Kristallbarrens als schmale Zone flüssig vorliegt und von zwei festen Phasen begrenzt wird (Abb. 7).

Die Schmelzzone wird in einem festen oder eingefrorenen Stab durch einen schmalen Heizkörper erzeugt und durch Kühlungen in Grenzen gehalten. Diese Kühlungen sorgen weiterhin für einen Temperaturgradienten im Grenzbereich der Schmelze und somit für die erwünschte Wärmekonvektion.

Wie beim Normalen Erstarren geschieht die Stofftrennung am Kristallisationsende, das mit der Schmelzzone langsam durch den Barren wandert. Dabei können sich die von der Kristallfront abgewiesenen Substanzen ($K < 1$) nicht über die restliche Substanzmischung verteilen, sondern reichern sich mit Voranschreiten der Zone mehr und mehr darin an (Abb. 8). Die Folge ist, daß auch in den ausgeschiedenen Mischkristallen

die Konzentration z. B. des Stoffes A so lange sich erhöht, bis die Ausgangskonzentration C_0 erreicht ist und das am vorderen Ende der Zone einschmelzende und am hinteren Ende auskristallisierende Material gleiche Zusammensetzung hat.

Es ändert sich also im weiteren Verlauf des Zonendurchganges die Konzentration des Kristallisates nicht mehr, bis das Schmelzende am Ende des Schmelzlings anlangt: an dieser Stelle folgt der Kristallisationsvorgang dem Normalen Erstarren. Vergleicht man die Konzentrationskurve der Abb. 8 mit derjenigen von Abb. 6, so wird man sofort erkennen, daß ein einmaliges Erstarren einen wesentlich besseren Trenneffekt mit sich bringt, als der Durchgang von einer Zone beim Zonenschmelzen.

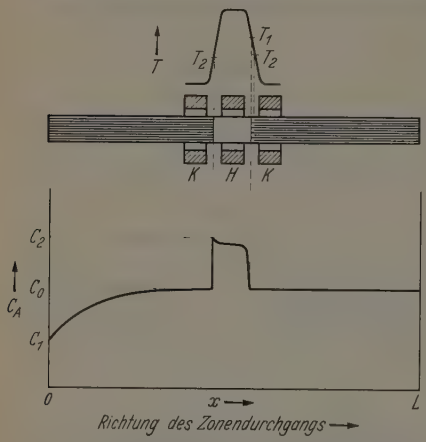


Abb. 8. Schematische Darstellung der Zonenschmelzmethode mit Konzentrationsverlauf eines Stoffes A im Substanzbarren (s. hierzu auch Abb. 4). K Kühlung; H Heizung

Bei Vorgabe von festen Lösungen wird man sich aber weder bei der einen noch bei der anderen Methode mit einem Arbeitsgang begnügen und den Trennprozeß mehrmals wiederholen. Methodisch zeigt hier das Zonenschmelzen große Vorteile, die darauf beruhen, daß gleichzeitig viele Schmelzzonen den gleichen Substanzbarren durchwandern können, bis ein nicht mehr zu überbietender stationärer Zustand sich eingestellt hat.

In Abb. 9 ist der Konzentrationsverlauf für eine Substanz A in einem Schmelzling nach 1—15 Zonendurchgängen dargestellt. Die Kurven wurden unter Berücksichtigung der in Abb. 5 aufgezeigten Konzentrationsabhängigkeit des Verteilungskoeffizienten und unter der Annahme, daß die feste Ausgangslösung $50\,\%$ A enthält für ein Verhältnis von $L/l = 10$ nach einem von HAMMING[10] angegebenen Verfahren errechnet.

Die Konzentrationskurven zeigen anschaulich den Verlauf des Zonenschmelzens von Mischkristallsystemen. Nach einem Zonendurchgang ist der größte Teil des Schmelzlings noch unverändert! Erst nachdem zehn Zonen den Barren passiert haben, ist die Konzentration von A von $50\,\%$ auf $10\,\%$ in dem zuerst erstarrenden Ende abgesunken. Nach 15 Zonen ist der Endzustand noch nicht erreicht, die Annäherung geht aber in den letzten Stufen nur noch sehr langsam vor sich. Für eine

weitere Aufteilung der Mischung kann man zunächst das Verhältnis L/l vergrößern, da der Grenzwert der Verteilung sich um so später einstellt, je kleiner die Schmelzzonenlänge l ist[2]. Abgesehen von apparativen Schwierigkeiten, welche die Verkleinerung der Zonen mit sich bringt, wächst der Zeitaufwand auch beim gleichzeitigen Durchgang von vielen, schmalen Schmelzzonen durch den Substanzbarren ins Untragbare. Am besten teilt man den Schmelzling rechtzeitig in Tochterschmelzlinge auf, die man erneut zonenschmilzt. Hat sich auch hier der stationäre Zustand nahezu eingestellt, so verfährt man auf die gleiche Weise und legt die Fraktionen mit gleicher Schmelzpunktsverteilung zusammen.

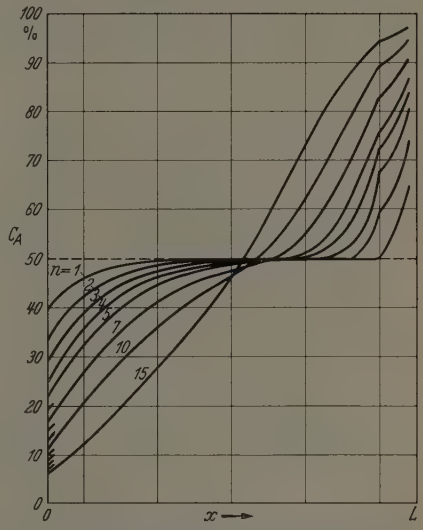


Abb. 9. Konzentrationsverlauf für einen Stoff A in einem Stab der Länge L nach 1—15 Zonendurchgängen. Ausgangskonzentration für A in der festen Lösung = 50%

Das „Zonenschmelz-Fraktionieren" ist eine Trennmethode, die mit Vorteil dann angewendet werden kann, wenn kleinste Mengen einer Substanzmischung in die Komponenten zerlegt werden sollen. Dann rechtfertigt sich auch der relativ hohe Zeitaufwand und die geringen Verluste, die sich lediglich beim Umfüllen und durch den Materialbedarf für die analytische Kontrolle des Trennvorganges ergeben. Beim Durchsatz von größeren Mengen machten sich die diskontinuierliche Arbeitsweise und die großen Trennzeiten besonders unangenehm bemerkbar. Wie gesagt, war nur durch Anwendung von sehr schmalen Zonen ein Fortschritt zu erwarten. Neben den bereits erwähnten Vorzügen würde auch die für die Stofftrennung äußerst wichtige Durchmischung in der Zone im idealen Maße gewährleistet sein und eng verbunden damit die gewünschte Erhöhung der Wanderungsgeschwindigkeit. Zonenbreiten unter einem halben Millimeter haben wir jedoch niemals verwirklichen können[21] vor allem nicht, wenn auch die kristalline Zone von der gleichen Dimension sein soll. Denkt man sich aber trotzdem den Substanzbarren aufgeteilt, in sehr viele und sehr schmale feste und flüssige Lamellen, wovon die kristallinen entgegengesetzt zu den flüssigen wandern, so wird man leicht

einsehen, daß dies nicht mehr mit den oben beschriebenen Heiz- und Kühlelementen geschehen kann. Wohl aber, wenn man die strenge Ordnung aufgibt und die Kristallamellen ungeordnet in ihrer Lage zueinander gegen die Schmelze bewegt. Von Zonen kann man dann nicht mehr sprechen, aber von einem Gegenstromverfahren, welches das Phasengleichgewicht fest-flüssig zur Trennung und Reinigung von Stoffen auszunützen gestattet.

In Abb. 10 der schematischen Darstellung des Kolonnenkristallierens, wie wir dieses Verfahren genannt haben[21], bedeuten die mit K bezeichneten Kästchen die Kristalle und S die Schmelze. In K ist von dem höher

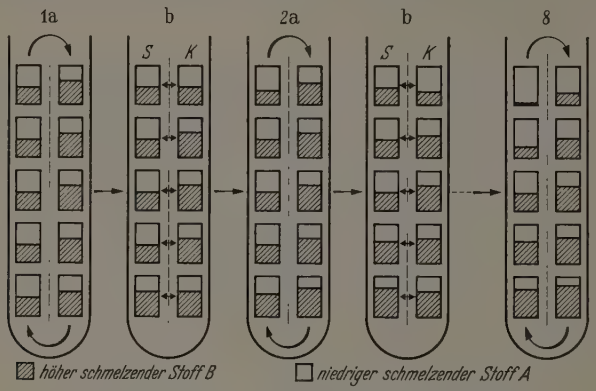


Abb. 10. Schema des Kolonnenkristallisierens. S Schmelze; K Kristalle

schmelzenden Stoff (schwarze Fläche) mehr enthalten als in S, wo die niedriger schmelzende Komponente (weiße Fläche) eines binären Mischkristallsystems überwiegt.

Beim Transport in der Kolonne werden die beiden im Gleichgewicht sich befindlichen Phasen voneinander dadurch getrennt, daß die Kristalle (K) nach unten und die Schmelze (S) nach oben bewegt werden. Dabei wird das oberste Volumenelement der Schmelze durch Wärmeentzug verfestigt (Übertritt von links nach rechts in Pfeilrichtung) und das unterste Volumenelement der Kristalle durch Wärmezufuhr verflüssigt. Die Folge ist ein neuer Gleichgewichtsschritt, der durch die waagerechten Pfeile im Teilbild 1 b angedeutet ist. Diese Vorgänge kann man sich solange wiederholt denken, bis die unter totalem Rücklauf betriebene Kolonne im Gleichgewicht ist (Teilbild 8). Da eine vollkommene Analogie zwischen der Destillation und der Kristallisation von Mischkristallsystemen in Gegenstromkolonnen besteht, bedarf es keiner weiteren Begründung, daß auch das Kolonnenkristallisieren wie diese kontinuierlich gestaltet werden kann.

Apparaturen und Versuche

Erstarrungsapparaturen

In Abb. 11, dem Photo einer Erstarrungsapparatur, kann man die wichtigsten Bauteile erkennen:

Die Kühlung, ein Dewar-Gefäß — gewöhnlich mit Aceton/Trockeneis-Mischung oder flüssiger Luft beschickt —, den Rührmotor und den Senkmotor, der mit einer Haltescheibe für das Substanzrohr durch Schnüre verbunden ist. In dem Maße wie sich die Achse dieses Motors dreht, senkt sich das Substanzrohr langsam (5—50 cm/Std) in die Kühlflüssigkeit. Die Wärmeabführung wird durch ein Kupferrohr erleichtert, so daß sich kurz über dem oberen Rand desselben eine glatte Kristallfläche ausbilden kann, trotz starker Durchmischung der Lösung mittels des kolbenförmigen Rührers.

Abb. 11

Durch Normales Erstarren ist es gelungen, noch hochverdünnte, wäßrige Lösungen von Aminosäuren[1], Phenolen, Chinonen und Ketonen schonend und verlustfrei so weit anzureichern, daß nicht mehr nachweisbare Mengen nach dem Erstarren analytisch in einwandfreier Weise erfaßt werden konnten. Zur Konzentrierung aus größeren Lösungsmittelmengen wird man dabei schrittweise vorgehen; zunächst engt man auf 100 ml ein, dann auf 10 ml und schließlich auf 0,1 ml und weniger, je nach Konzentration der Ausgangslösung. Die Anreicherung gelingt am besten bei sehr verdünnten Lösungen von Wasser, Tetrachlorkohlenstoff, Methylenchlorid, Chloroform und Benzol und sie wird von der Rührgeschwindigkeit beeinflußt, wie man der Abb. 12 entnehmen kann[15].

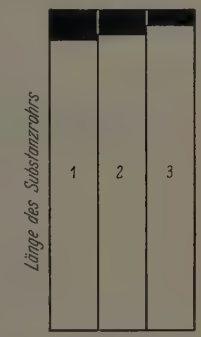


Abb. 12

Bei allen drei Versuchen wurde von einer 0,1%igen, wäßrigen Kaliumpermanganatlösung ausgegangen. Das Endvolumen verringerte sich mit zunehmender Umdrehungszahl des Rührers und umgekehrt stieg dabei die Endkonzentration an. Selbstverständlich kann man durch Normales Erstarren auch

Abb. 11. Erstarrungsapparatur[20] Oben: Senkmotor, Mitte: Rührmotor, Rührer und Substanzrohr Unten: Dewargefäß

Abb. 12. Schematische Darstellung des Anreicherungseffektes bei verschiedenen Rührgeschwindigkeiten. *1* 1400 U/min; *2* 2200 U/min; *3* 3000 U/min

kristallisierbare, feste und flüssige Stoffe reinigen. Alle Versuche mit 2,4-Dinitrotoluol, Acetamid, 4-Chlor-1,3-dinitrobenzol, Kaliumbromid, Essigsäure und Ameisensäure verliefen positiv[20]. Ausgehend von wäßrigen Lösungen von Wasserstoffperoxyd gelang dessen Konzentrierung auf 99—100%. Bei Austauschversuchen mit Tritiumwasser wurde sowohl auf das Lösungsmittel als auch auf die gelöste Verbindung Wert gelegt[16,22]. Es gelang noch μg-Mengen von Phenolen nach dem Austauschverfahren mit Tritium zu markieren und zu isolieren, wobei auch das Tritiumwasser in reinster Form und gefahrlos wieder zurückgewonnen werden konnte.

Abb. 13. 15stufige Zonenschmelzapparatur[1]

Mehrstufige Zonenschmelzapparaturen für präparative Stofftrennungen

Wie bereits dargelegt, kann nur bei sinngemäßer Heizung und Kühlung, bei kleinen Laufgeschwindigkeiten und deswegen nur mit mehrstufigen Apparaturen mit dem maximal möglichen Trenneffekt gerechnet werden. Eine Zonenschmelzanordnung[13], die allen diesen Richtlinien gerecht wird, ist in Abb. 13 abgebildet.

Abb. 14. Substanzrohr — 2,4-Dinitrotoluol nach der Zonenschmelze mit 14 Zonen

Die Apparatur ist aus einem 1 cm starken Cu-Rohr hergestellt, das zu Windungspaketen zusammengerollt worden ist. Es wird bei Betrieb von einer Kühlsole oder nur mit Wasser durchflossen. Zwischen den Kühlelementen sind 15 Ringheizkörper angebracht. Durch diese Anordnung von Kühl- und Heizelementen wandert das etwa 2 cm starke Substanzrohr, je nach Art der zu reinigenden Substanz 2 mm bis 1 cm in der Stunde.

Abb. 14 zeigt ein mit 2,4-Dinitrotoluol beschicktes Substanzrohr, bei dem schon äußerlich ein guter Reinigungseffekt nach dem Durchgang von 14 Schmelzzonen erkennbar war. Hier zeigte sich vor allem, was auch bei anderen Verbindungen immer wieder beobachtet werden kann, daß das Zonenschmelzen geeignet ist, auch im Hochvakuum nicht entfernbare Lösungsmittelspuren nach dem Umkristallisieren zu beseitigen.

Das blaßgelbe, durchsichtige 2,4-Dinitrotoluol am Kopf des Rohres bestand aus bis zu 8 cm langen Einkristallen, während das orangebraune Ende kleine verfilzte Nadeln enthielt (Abb. 15).

Abb. 15. Durch Zonenschmelzen gereinigtes 2,4-Dinitrotoluol. links: unreines Ende und rechts: reiner Kopf des Schmelzlings

Auch die IR-Spektren der beiden Enden des Schmelzlings charakterisierten die erreichte Reinigung. Das Spektrum des verunreinigten Teiles war reicher an schwach ausgeprägten Banden und ließ p-, o- und Trinitrotoluol als Verunreinigungen vermuten.

Mit ähnlichen Apparaturen[13], wie die beschriebene, wurden durch mehrstufiges Zonenschmelzen u. a. Naphthalin, Diphenyl, Stilben, Tolan, 4-Chlor-1,3-dinitrobenzol, Phenol, Zimtsäure, Azobenzol und Acetamid präparativ gereinigt. Für die Kontrolle des Reinigungsvorganges erwies sich der Methode am besten angepaßt die Schmelzpunktsbestimmung entlang des Schmelzlings, nachdem man den umgeschmolzenen Substanzbarren mitsamt dem Substanzrohr in einzelne Fraktionen zerteilt hat. Ungenügende Reinigung erkennt man an dem sehr unregelmäßigen Verlauf der Schmelzpunktskurve(Abb. 16), wogegen das zonengereinigte Material durch ein deutliches Schmelzpunktsniveau charakterisiert ist (Abb. 17).

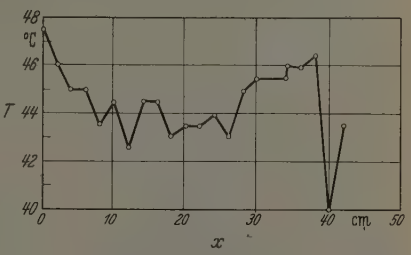


Abb. 16. Schmelzpunktverlauf entlang eines Benzophenonschmelzlings, nach 3 Zonen ($v = 2$ mm/Std) FP der Ausgangssubstanz: 43,2—45° C

Das umgeschmolzene Benzophenon war nach 18 Zonen farblos und zeigte einen scharfen Schmelzpunkt von 48° C. Das unreine, zuletzt erstarrte Ende des Schmelzlings war dagegen bereits feucht.

Größeren Zeitaufwand als die Reinigung von Substanzen erfordert natürlich die mit Erfolg durchgeführte präparative Trennung von Strukturisomeren, wie 3,4-Dimethylphenol und 3,5-Dimethylphenol[14]. Im allgemeinen sind Isomere dieser Art durch Destillation nur schwierig zu trennen, da sie nur geringe Siedepunktsunterschiede aufweisen. Oft wesentlich größer ist dagegen die Schmelzpunktsdifferenz. Wir haben die

erwähnten Phenole für das Studium des Zonentrennens von Isomeren gewählt, um zu beweisen, daß selbst in ungünstigen Fällen (Δ FP = 3°C) noch eine Trennung möglich ist. Wir gingen aus von 20,3 g Gemisch, das aus 88% 3,5-Dimethylphenol und 12% 3,4-Dimethylphenol bestand. Nach dem Zustandsdiagramm zu schließen, mußte die Zonenschmelz-Fraktionierung zu 15,6 g reinem 3,5-Dimethylphenol und 4,7 g Eutektikum führen. Danach konnte die reine Verbindung mit 95%iger Ausbeute erhalten werden. Nicht rein war das Eutektikum, da dessen Schmelztemperatur von 24,5°C zu niedrig für die Zonenschmelzapparatur lag. In solchen Fällen muß man auf Eiszonenschmelzapparaturen übergehen (Abb. 18). Prinzipiell sind diese gleich gebaut wie die Zonenschmelzapparate für bei Raumtemperatur feste Substanzen. Lediglich die Kühlung ist umfassender und die gesamte Anordnung muß gut isoliert werden.

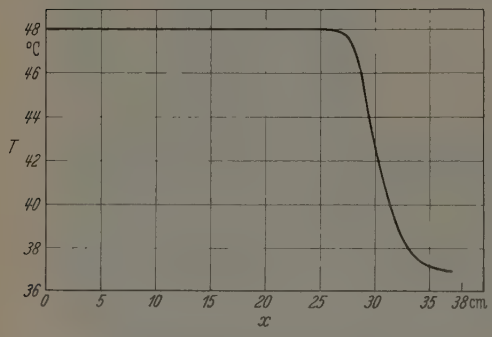


Abb. 17. Schmelzpunktsverlauf entlang eines Benzophenonschmelzlings nach 18 Zonen ($v = 3$ mm/Std)

Abb. 18
Geöffnete 24stufige Eiszonenschmelzapparatur[13]

Zonenschmelzapparatur für mg-Mengen

Die Bearbeitung von kleinsten Mengen erfordert besonders wirksame Apparaturen mit vielen Heiz- und Kühlzonen, damit auch noch in sehr kurzen Schmelzlingen einige Schmelzzonen untergebracht werden können, was bei den beabsichtigten Wanderungsgeschwindigkeiten von 1 bis

3 mm/Std eine nicht geringe Zeitersparnis bedeutet und der Zonenschmelzeffekt bei Verwendung von schmalen Zonen erhöht werden kann.

Das wichtigste an der in Abb. 19 abgebildeten Mikro-Zonenschmelzapparatur[17] sind Kupferdrahtschlingen, mit denen gekühlt oder geheizt wird, je nachdem diese von einem Kühlrohr oder von einem Heizrohr ausgehen. Es ist eine Apparatur, die auf kleinstem Raum sehr viele Heiz- und Kühlelemente vereinigt.

Durch die zusammengefaßte, blockmäßige Heizung und Kühlung ist gewährleistet, daß alle Heiz- bzw. Kühlschlingen jeweils dieselbe Temperatur aufweisen und dadurch alle in der Apparatur erzeugten Schmelzzonen dieselbe Länge besitzen, falls der Temperaturgradient nicht zu

Abb. 19. Mikrozonenschmelzanordnung in Aufsicht photographiert. Oben: Anschluß für Kühlung. Unten: Anschluß für Heizung

flach ist oder die Unterschiede der Schmelzpunkte im Substanzbarren nicht zu groß sind. Durch die Abstimmung von Heiz- und Kühltemperatur kann eine Überhitzung der Substanz ausgeschlossen werden.

Allgemein gesagt, kann der mit Abb. 19 gezeigte Apparatetyp durch Variation der Breite und des Durchmessers der Kupferschlingen besonderen Aufgaben hinsichtlich des Schmelzintervalls und der Menge der Substanzen angepaßt werden. Während Apparaturen mit relativ breiten Heizungen und Kühlungen in gleicher Weise zur Trennung (Auftreten größerer Schmelzintervalle) wie zur Reinigung verwendet werden können, sind solche mit sehr schmalen Heiz- und Kühlelementen zweckmäßig nur zur Reinigung zu verwenden. Die von uns verwendeten Apparatetypen sind in der Tabelle (S. 268) zusammengefaßt.

Zehn solcher Apparaturen haben wir zu einer „Zonenschmelzbank" auswechselbar montiert (Abb. 20).

In der Mitte befindet sich eine Welle, die von einem Synchronmotor mit 1 U/24 Std angetrieben wird. Sie trägt für jede Apparatur eine Stufenscheibe mit

vier verschiedenen Durchmessern. Damit ist es möglich, unabhängig jedes Substanzschiffchen mit den Geschwindigkeiten 0,5; 1; 2 und 3 mm/Std laufen zu lassen. Durch ein Gegengewicht, das an der Zugstange des Schiffchens eingehängt wird, ist eine straffe Führung des Schmelzschiffchens gesichert.

Tabelle
KS = Kühlschlinge; HS = Heizschlinge

Typ	⌀ von HS und KS mm	Breite der HS mm	Breite der KS mm	Abstand HS—KS mm	Zahl der HS	Länge des Systems mm
1	3,2	1,6	2,4	1,0	20	120
2	2,0	1,6	2,4	1,0	20	120
3	1,6	1,6	2,4	1,0	20	120
4	1,6	1,6	1,6	0,9	25	125
5	1,6	1,0	1,0	0,5	20	60
6	1,2	1,0	1,0	0,5	20	60

Für Substanzen, die bei ihrem Schmelzpunkt nicht merklich flüchtig sind — z. B. Paraffine, Fettalkohole, Fettsäuren, deren Ester und Wachse — haben sich Glasschiffchen mit halbkreisförmigem Querschnitt sehr gut bewährt (Abb. 21).

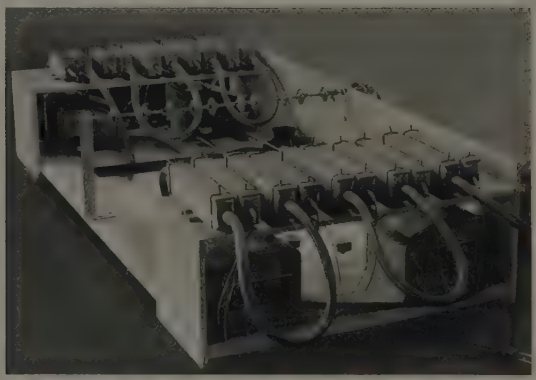


Abb. 20. Zonenschmelzbank: 10 Mikroapparaturen verschiedener Größe mit Heiztransformatoren

Flüchtige Verbindungen füllt man in Glasröhrchen von passendem Durchmesser, wobei man als vordere Begrenzung des Schmelzlings einen etwa 1 mm langen, dicht passenden Stopfen aus Siliconkautschuk in das Röhrchen einschiebt[19]. Die Verwendung von Substanzröhrchen gibt die Möglichkeit, unter Schutzgas zu arbeiten. Eine weitere Möglichkeit, luft- oder feuchtigkeitsempfindliche Stoffe beim Zonenschmelzen vor der Zersetzung zu bewahren, besteht darin, eine die Substanz enthaltendes offenes Schiffchen in ein Glasrohr passender Weite einzuführen und mit

einem, über dem am Schiffchen angeschmolzenen, schwach konischen Glasstab gezogenen Siliconschlauch dicht abzuschließen (Abb. 22).

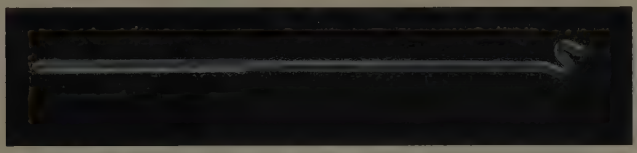


Abb. 21. 30 mm langes und 1—1,5 mm dickes Mikroschiffchen aus Glas mit Zugstange

Wie bereits erwähnt, ist die Anwendung des Zonenschmelzverfahrens nur dann sinnvoll, wenn Mischkristalle zu trennen bzw. zu reinigen sind oder ein Eutektikum bildendes System in so geringer Menge vorliegt, daß

Abb. 22. Zonenschmelzschiffchen *S* im geschlossenen Glasröhrchen *R*. *SC* Siliconschlauch

die Handhabung des Normalen Erstarrens technische Schwierigkeiten bereitet. Wir wählten deswegen für das Studium des Mikrozonenschmelzens eine geringe Menge eines Gemisches aus 80% Hexacosanol $C_{26}H_{53}OH$ und 20% Eicosanol $C_{20}H_{41}OH$, das sicher in Form von Mischkristallen vorlag und mit den üblichen Methoden nicht zu trennen war. Es sollen hier nur einige repräsentative Schmelzpunktskurven wiedergegeben werden, die durch Schmelzpunktsbestimmungen entlang der beim Zonenschmelz-Fraktionieren anfallenden Schmelzlinge gefunden wurden. Aus ihrem Verlauf lassen sich Schlüsse auf die Reinheit einer erhaltenen Substanz oder auf sonstige Besonderheiten, die das bearbeitete Stoffsystem aufweist, ziehen.

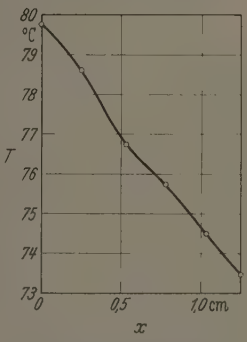


Abb. 23. Schmelzpunktverlauf entlang eines Mikroschmelzlings einer Mittelfraktion nach 45 Zonen $v = 3$ mm/Std

Abb. 23 zeigt den typischen Schmelzpunktsverlauf einer Mittelfraktion, die mit 45 Zonendurchgängen bei 3 mm/Std Wanderungsgeschwindigkeit zonengeschmolzen wurde.

In Abb. 24 ist die Schmelzpunktskurve der Fraktion 31 nach 45 Zonen wiedergegeben. Der flache Verlauf der Kurve in der linken Hälfte des Diagramms — entsprechend dem vorderen Teil des Schmelzlings — ist das Zeichen für eine beginnende Abscheidung eines reinen Stoffes, hier Hexacosanol.

Der Knick in der Schmelzpunktskurve der Abb. 25 ist der Auswirkung eines Peritektikums zuzuschreiben. Wir werten diese Tatsache als ein besonderes Zeichen für den präzisen und programmäßigen Verlauf der Zonenschmelzfraktionierung, die in nahezu idealer Weise den Gesetzen von Phasengleichgewichten gehorcht.

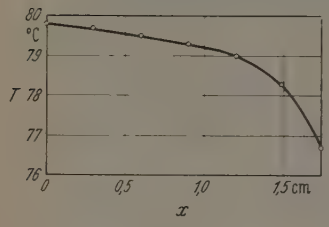


Abb. 24

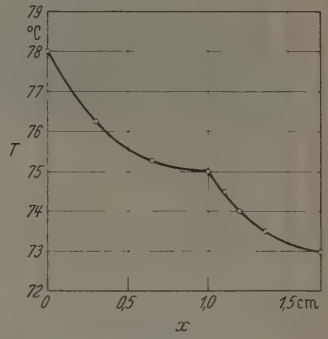


Abb. 25

Abb. 24. Schmelzpunktsverlauf entlang des Schmelzlings der Fraktion 31 nach 30 Zonen mit $v = 3$ mm/Std und 15 Zonen mit $v = 2$ mm/Std

Abb. 25. Schmelzpunktsverlauf entlang eines Schmelzlings der Fraktion 12 nach 20 Zonen mit $v = 3$ mm/Std

Im weiteren Verlauf des Zonentrennens gelang es, das höher schmelzende Hexacosanol in ausgezeichneter Reinheit mit einem Schmelzpunkt von 80,3° C zu isolieren.

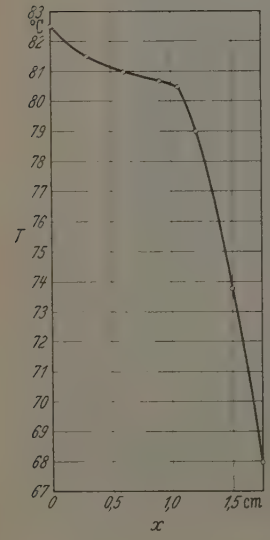


Abb. 26. Schmelzpunktsverlauf entlang des Schmelzlings eines Rohwachses von Eriopeltis festucae nach 20 Zonen mit $v = 1$ mm/Std

Nachdem gezeigt worden war, daß die Trennung von festen Lösungen möglich ist, war es reizvoll, das Mikrozonenschmelzen auf ein Naturstoffgemisch anzuwenden. Zu diesen Untersuchungen wählten wir das Wachs von Eriopeltis festucae, das diese Grasschildlaus über ihren Ei-Gelegen als feines, verfilztes Fasergespinst ausscheidet[21]. Die Zuordnung der Zonenschmelzfraktionen (zusammen 50 mg) wurde auch hier wieder nach den Schmelzpunkten vorgenommen. Die Schmelzpunktskurve des zonengeschmolzenen Rohwachses ist in Abb. 26 gezeigt. Beiderseits des Knickpunktes bei 80,5° C wurden verschiedene Kristallarten der Mischungen beobachtet und damit ein Peritektikum im System nachgewiesen. Mit Fraktion 127 konnte schließlich nach ergiebigem Zonenschmelz-

Fraktionieren 1 mg einer bei 84,3° schmelzenden Substanz gefaßt werden, die wir durch eingehende infrarotspektroskopische Analyse und Vergleich mit einem synthetischem Produkt als Hexacosansäure-hexacosylester identifiziert haben.

Die prächtige Übereinstimmung der in Abb. 27 gezeigten Infrarotspektren des Insektenwachses mit dem synthetischen Ester, ist nicht nur

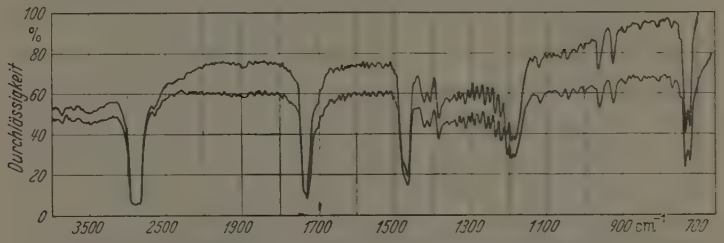


Abb. 27. Infrarot-Absorptionskurven von Hexacosansäure-hexacosylester. Oben: Synthetisches Produkt. Unten: Insektenwachs

ein Beweis für die Identität der beiden Stoffe, sondern auch dafür, daß selbst im mg-Maßstab durchgeführte Synthesen durch Mikrozonenschmelzen analytisch verwertbar werden.

Apparaturen zum Kolonnenkristallisieren

Der gewünschte Gegenstrom von kleinen Kristallen gegen eine Schmelze oder Lösung konnte nach vielen tastenden Versuchen in einfacher Weise mit der in Abb. 28 skizzierten Versuchsanordnung verwirklicht werden[18].

Sie besteht aus zwei ineinandergeschobenen, feststehenden Glasrohren. Zwischen diesen Rohren dreht sich in einem Ringspalt eine Spirale aus Vierkant-Stahldraht so, daß die von ihr zu transportierenden Kristalle nach unten bewegt werden. Die Zuführung der Schmelzwärme erfolgt am untersten Ende des Substanzrohres und nur ausnahmsweise bei höher schmelzenden Substanzen — wie in Abb. 28 eingezeichnet — als Gefällheizung über das ganze Rohr hinweg. Außerdem wird zur Durchführung einer adiabatischen Arbeitsweise der Mittelteil des Rohres mit einem Isoliermantel umgeben. Die Abführung der Kristallisationswärme am oberen Kolonnenende wird durch Veränderung der Isolierung oder durch einen Kühlmantel bewirkt, der dann von einer entsprechend temperierten Kühlflüssigkeit durchflossen wird. Bewährt hat sich auch eine Gegenheizung im oberen Teil des Innenrohres R_2[11].

Die aus Abb. 28 entnehmbaren Maße der Versuchsapparatur stellen keineswegs die allein mögliche Dimensionierung einer Kristallisationskolonne dar. Der Durchmesser und insbesondere die Länge und damit der Wirkungsgrad können wesentlich heraufgesetzt werden. Nach vorsichtiger Schätzung haben wir in vielen Versuchen bislang mit einer 20 cm langen Kolonne 8—10 theoretische Böden verwirklichen können.

Verbesserungen erwarten wir uns von der richtigen Wahl der Art und Form der Spirale, deren Windungszahl, Durchmesser und der Drehgeschwindigkeit, die bis jetzt zwischen 50 und 150 U/min gewählt wurde[11]. Versuche, das Verfahren in den Mikromaßstab zu übertragen, verliefen erfolgversprechend. Die hierzu verwendete Apparatur ist in Abb. 29 schematisch wiedergegeben.

Sie entspricht in allen Teilen der Makroapparatur, lediglich das Innenrohr ist

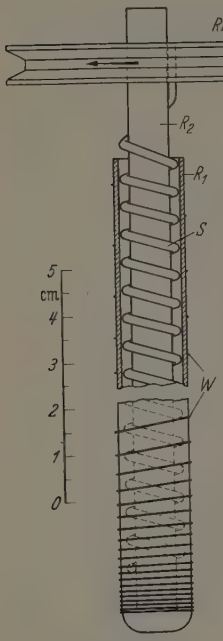


Abb. 28

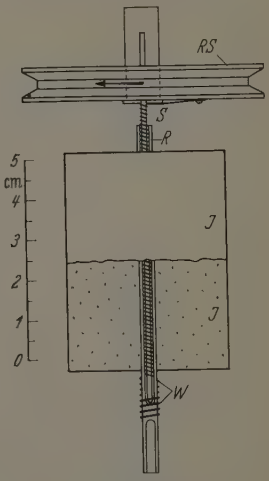


Abb. 29

Abb. 28. Skizze der Versuchsanordnung zum Kolonnenkristallisieren. *RS* Riemenscheibe; R_2 Innenrohr, R_1 Substanzrohr, *S* Metallspirale, *W* Heizwicklung aus Widerstandsdraht

Abb. 29. Schematisierte Apparatur zum Mikro-Kolonnenkristallisieren. *RS* Riemenscheibe, *S* Metallspirale, *R* Substanzrohr, *J* Isolierung, *W* Heizwicklung aus Widerstandsdraht

durch einen Stahldraht ersetzt. Allerdings ist die Handhabung solcher Apparaturen für Substanzmengen von 100 mg bereits mit Schwierigkeiten verbunden.

Unsere ersten Versuche wurden unter totalem Rücklauf, also ohne Zuführung von Ausgangsmaterial oder Produktenentnahme während des Trennprozesses durchgeführt. Nach Beendigung der Experimente wurde der in der 14—15 cm langen Kolonne enthaltene Kristallbrei (8—10 g) abgeschreckt und über die ganze Länge der Substanz Schmelzpunkte genommen, als Punkte der primären Kristallisation. Abb. 30 zeigt eine kleine Auswahl der so gewonnenen Schmelzpunktskurven (FP gegen Abstand vom unteren Ende der Kolonne), graphisch dargestellt. Sie

sind schon rein äußerlich den Kurven ähnlich die durch Zonenschmelzen gewonnen worden sind und dokumentieren oft dieselbe Schmelzpunktsreinheit über einen mehr oder minder ausgedehnten Substanzbereich.

Beachtlich ist der zeitliche Gewinn beim Kolonnenkristallisieren, wo zuweilen für den gleichen Trenneffekt beim Zonenschmelzen 10 Tage, beim Kolonnenkristallisieren aber nur 2,5 Std benötigt wurden.

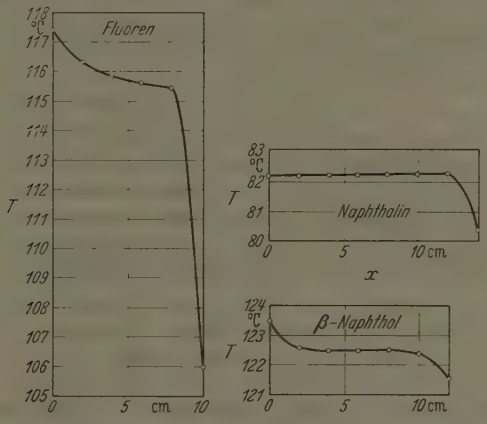


Abb. 30. Schmelzpunktsverlauf entlang eines kolonnenkristallisierten Substanzstabes nach 2stündiger Laufzeit der Spirale

Für sehr gute Zusammenarbeit danke ich meinen Mitarbeitern, Herrn Dr. H. Vetter, Dipl.chem. F. Schlegelmilch, Frl. Dipl.chem. U. Hopf und Frl. Dipl.chem. S. Rössler, sowie Herrn Dipl.chem. K. Maas.

Unsere Arbeiten wurden wesentlich gefördert durch dankenswerte Unterstützung, finanzieller und sachlicher Art, vom Bundesministerium für Atomkernenergie und Wasserwirtschaft, der Max Buchner-Stiftung und der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Literatur

[1] Benoni, H.: Diplomarbeit Erlangen 1960. — [2] Burris jr., L., C. H. Stockman and J. G. Dillon: Trans. AIME **203**, 1017 (1955). — [3] Burton, J. A., and W. P. Slichter: Transistor Technology, Vol. I, D. Van Norstrand, Princeton, N. J., 1958, Chapter 5. — Burton, J. A., R. C. Prim and W. P. Slichter: J. chem. Physics **21**, 1987 (1953). — [4] Findlay, A.: Die Phasenregel, Verlag Chemie, Weinheim, 9. Aufl., 1958. — [5] Gulliver, G. H.: Metallic Alloys, Chas. Griffin and Comp., London 1922. — [6] Hayes, A., and J. Chipman: Trans. AIME **135**, 85 (1939). — [7] Hopf, U.: Diplomarbeit Erlangen 1960. — [8] McFee, R. H.: J. chem. Physics **15**, 856 (1947). — [9] Pfann, W. G.: Trans. AIME **194**, 747 (1952). — [10] Pfann, W. G.: Zone Melting, John Wiley & Sons, Inc., New York—London, 1958, S. 35. — [11] Rössler, S.: Diss. Erlangen 1961. — [12] Scheuer, E.: Z. Metallkunde **23**, 237 (1931). — [13] Schildknecht, H., u. U. Hopf: Chem.-Ing.-Techn. **33**, 352 (1961). — [14] Schildknecht, H., u. U. Hopf: unveröffentlicht. — [15] Schildknecht,

H., G. RAUCH u. F. SCHLEGELMILCH: Chemiker-Ztg., Chem. App. **83**, 549 (1959). — [16] SCHILDKNECHT, H., u. F. SCHLEGELMILCH: Conference on the Use of Isotopes in the Physical Sciences and Industry, Kopenhagen 1960, RICC/157. — [17] SCHILDKNECHT, H., u. H. VETTER: Angew. Chem. **71**, 723 (1959). — [18] SCHILDKNECHT, H., u. H. VETTER: Angew. Chem. **73** (1961), im Druck. — [19] SCHILDKNECHT, H., u. H. VETTER: Angew. Chem. **73**, 240 (1961). — [20] SCHLEGELMILCH, F.: Diss. Erlangen 1961. — [21] VETTER, H.: Diss. Erlangen 1960. — [22] VOLKERT, O.: Diplomarbeit Erlangen 1961.

Priv.-Doz. Dr. H. SCHILDKNECHT,
Institut für Organische Chemie d. Universität Erlangen, Fahrstr. 17

---

3. Trennung durch Phasengleichgewichte unter Verwendung einer Hilfsphase

Institut für Organische Chemie an der Universität Erlangen

Chromatographische Verfahren in der organischen Chemie

Von
GERHARD HESSE

(Eingegangen am 27. Oktober 1960)

Das Wesen der Chromatographie besteht im gleichmäßigen Strömen einer Lösung (oder eines Gasgemisches) durch eine Schüttung fein verteilter Substanz, die gewisse Bestandteile der Lösung (oder des Gases) vorübergehend aufnimmt und hierdurch in ihrer Wanderung aufhält. Für die Definition ist es gleichgültig, auf Grund welcher physikalischen Vorgänge die Verlangsamung erfolgt. Will man aber *systematisch* ein chromatographisches System aufbauen und betreiben, so ist die Kenntnis der Grundvorgänge unerläßlich.

Das Füllmaterial der Trennsäule bindet in der Regel sowohl die gelösten Substanzen wie das Lösungsmittel. Letzteres ist stets in großem Überschuß vorhanden und muß deshalb um Größenordnungen schwächer sorbiert werden, wenn für die Inhaltsstoffe überhaupt noch Bindungskraft übrigbleiben soll. Es gibt z. B. keine flüssigen Lösungsmittel, mit denen gesättigte Kohlenwasserstoffe konkurrieren könnten. Hier muß man als Spülmittel Gase nehmen, denn sie sind stofflich sehr verdünnt und ihre Molekeln werden besonders schwach adsorbiert (Gaschromatographie).

Die Konkurrenz zwischen dem Lösungsmittel und den gelösten Stoffen um die Sorption, die zunächst als ein begrenzender Faktor erscheint, gibt nun zugleich die beste Handhabe zur *Regelung* einer chromatographischen Trennung. Das Spülmittel kann man während des Versuchs verändern, das Sorptionsmittel nicht. Ein gegebenes Adsorbens wird je

nach dem verwendeten Lösungsmittel den gleichen Stoff fest, mäßig oder gar nicht mehr binden. Eine Zonenbildung in der Säule, die die Voraussetzung zur Trennung mehrerer ähnlicher Stoffe ist, erreicht man nur im Falle mäßiger, reversibler Bindung. Man muß also Sorbens und Lösungsmittel (oder Spülmittel) so aufeinander abstimmen, daß dieser Zustand eintritt: man muß das *Sorptionsmilieu* passend wählen.

Wie man hier vorgehen kann, läßt sich am besten an einem klassischen Fall der *Adsorptionsanalyse* zeigen, der Trennung cis-trans-isomerer α-Carotine[23]. Reines „all-trans"-α-Carotin (6 mg) wird in Benzin gelöst und nach Zusatz einer Spur Jod als Katalysator 30 min hellem Tageslicht ausgesetzt. Beim Einsickern in eine $Ca(OH)_2$-Säule erhält man zunächst nur ein einziges wenig differenziertes Band am oberen Ende der Füllung. Nun wäscht man mit dem gleichen Benzin, dem aber 0,5% Aceton zugesetzt sind. Das Aceton konkurriert jetzt mit den Carotinisomeren um das Adsorbens und bringt sie zum Wandern. Dabei bilden sich 8 gelbe Zonen aus, die durch farblose Bezirke deutlich von einander geschieden sind. Man kann die Substanzen mitsamt dem Adsorbens, auf dem sie haften, voneinander trennen. Durch eine nochmalige Schwächung des Sorptionsmilieus, nämlich durch einen Methanolzusatz zum Benzin, erreicht man die vollständige Ablösung der adsorbierten Stoffe von ihrem Träger (Elution).

In diesem Versuch ist 3mal von der Erfahrung Gebrauch gemacht worden, daß sich die Stärke der Sorption bei gegebenem Sorbens mit der Zusammensetzung des Lösungsmittels ändert. Aus reinem Benzin wird jedes Carotinisomere dort irreversibel festgehalten, wo es zuerst auf das Adsorbens trifft; der geringe Acetongehalt mindert die Bindung zu einem Gleichgewichtszustand und gibt durch die verschiedene Lage dieses Gleichgewichts die Handhabe zur Trennung. Der Methanolzusatz schließlich duldet kein Carotin mehr auf der Oberfläche des Calciumhydroxyds.

Um diese Erfahrung zu Voraussagen nutzen zu können, hat man *Lösungsmittelreihen* aufgestellt. Sie ordnen die in Betracht kommenden Flüssigkeiten danach an, wie stark sie die Adsorption an einem gegebenen Sorbens mindern. Für Aluminiumoxyde z. B. gilt folgende Reihe[19]:

Benzin-Tetrachlorkohlenstoff-Trichloräthylen-Benzol-Methylenchlorid-Chloroform-Äther-(Dimethylformamid)-Essigester-Pyridin-Aceton-n-Propanol-Äthanol-Methanol-(Formamid)-Wasser-Glykol-(Glycerin).

Fast die gleiche Folge findet man für alle Oxyde, Hydroxyde und Sauerstoffsalze, wenn die Bindung nur durch Van der Waalssche Kräfte erfolgt. Für Aktivkohle aber gilt annähernd die inverse Reihenfolge.

Es ist klar, daß diese Methode nur dann befriedigen kann, wenn die zu trennenden Stoffe sich in ihrer Adsorbierbarkeit *wenig* unterscheiden.

Sonst gibt es keine Lösungsmittelkombination, bei der sie sich *alle* gerade im Zustand der *reversiblen* Adsorption befinden. Meist liegen aber Gemische vor, deren Bestandteile viel stärker differieren als hier die Stereoisomeren eines einzigen Stoffes. In Extrakten aus Nebennierenrinde, in den Auszügen von Herzgiftdrogen und oft auch in Gemischen, die als Ergebnis einer Synthese anfallen, hat man es mit Stoffen zu tun, die sich in ihren Bruttoformeln und in der Zahl und Art der funktionellen Gruppen unterscheiden. Hier verwendet man die *Elutionsanalyse*. Man beginnt wieder mit einem sehr strengen Milieu und erreicht dann durch Aufgabe der ursprünglichen Lösung — am besten wieder in Benzin — die ungetrennte Adsorption mehrerer Substanzen am Kopf der Säule. Nun steigert man stufenweise oder stetig die Elutionskraft der strömenden Phase durch Zusätze, die man an Hand der Lösungsmittelreihe wählt. Für jeden Bestandteil der primären Zone kommt dann einmal ein Milieu zustande, in dem seine Bindung reversibel wird und die Wanderung beginnt. Im Auslauf der Säule erscheinen nacheinander die Komponenten des aufgebrachten Gemisches in gelöster Form und können durch Eindampfen rein erhalten werden. Die hierzu gehörende hochentwickelte Technik mit Mischkammer für die Lösungsmittel und Fraktionssammler am Auslauf kann nicht im einzelnen besprochen werden[10].

Diese Elutionschromatographie spannt nicht nur weiter als die klassische Methode von TSWETT, sondern sie gibt auch besonders scharfe Trennungen bei verhältnismäßig konzentrierten Fraktionen. Der Grund liegt im folgenden: Durch das zudosierte zweite Lösungsmittel wird die Säulenfüllung von oben her desaktiviert und es stellt sich ein Aktivitätsgradient ein. Jede wandernde Zone befindet sich dann mit ihrem vorderen Ende in einem strengeren Sorptionsmilieu als an ihrem hinteren. Vorne wandert die Substanz langsamer als hinten, die Zone wird konzentriert und gewissermaßen gestaucht. Im Grenzfall kann man Zusätze verwenden, die die vollständige Elution aller adsorbierten Stoffe bewirken. Man braucht dann zwar wenig Lösungsmittel und Zeit, aber der Erfolg ist schlecht realisierbar, weil die Fraktionen lückenlos aufeinander folgen und nicht mehr durch leeres Lösungsmittel voneinander getrennt sind.

Bei sorgfältiger Anwendung der Milieueinstellung sollte man mit einem einzigen Adsorbens in allen Fällen auskommen, einem der stärksten, das man auf jede geringere Aktivität einstellen kann: Dies ist auch weitgehend der Fall. Als Grundmaterial hat sich *Aluminiumoxyd* eingebürgert, denn es kann verhältnismäßig leicht stets in der gleichen Qualität erhalten werden. Es hat sich nun nicht bewährt, immer mit der höchsten Aktivität zu beginnen. Starke Adsorptionsmittel katalysieren häufig Veränderungen der adsorbierten Stoffe, die natürlich

durch eine nachträgliche Milieumilderung nicht mehr rückgängig gemacht werden können. Wo man bei der Analyse mit einer geringeren Aktivität auskommt, desaktiviert man besser *vorher* durch eine dosierte Vorbelegung der Oberfläche. BROCKMANN hat dafür Wasser eingeführt und auch eine Standardisierung mit Farbstoffmischungen angegeben, die sich bewährt hat[10].

Nun tritt aber eine neue Schwierigkeit auf. Im Laufe einer Trennung verschleppt der Lösungsmittelstrom einen Teil des Wassers in tiefere Säulenbezirke. Man erhält dadurch eine *umgekehrte Gradientensäule;* unscharfe Zonen und verdünnte Fraktionen sind die notwendige Folge. Man kann dies teilweise beheben, wenn man die Aktivität durch Vorbelegung mit Glykol oder Glycerin einstellt. Besser ist es noch, die Lösungsmittel generell mit soviel Wasser zu versetzen, daß sie mit der gewählten Aktivitätsstufe im Gleichgewicht sind. Am besten verwendet man ein wenig mehr Wasser, um der Säule einen leichten Gradienten in der gewünschten Richtung zu geben. Die erforderlichen Wasserzusätze haben wir experimentell festgelegt[19] (Tab. 1).

Tabelle 1. *Isotonische Wassergehalte in Volumprozenten für neutrales Aluminiumoxyd Woelm in den Aktivitätsstufen II—V*

Fließmittel	Aktivitätsstufe				
	I	II	III	IV	V
Benzol (Toluol)	—	0,012	0,036	0,043	0,045
Chloroform	—	0,036	0,083	0,098	0,11
Methylenchlorid	—	0,05	0,13	0,15	0,17
Diäthyläther	—	0,15	0,55	0,73	0,75
Essigester	—	0,57	2,1	2,4	2,6

Für Benzin, Cyclohexan und Tetrachlorkohlenstoff sind die isotonischen Wassergehalte so klein, daß sie nicht mehr genau bestimmt werden konnten; hier treten die besprochenen Störungen auch kaum auf.

Die bisherigen Überlegungen enthalten die Annahme, daß die Adsorptionskräfte *nicht spezifisch* von der Natur des Adsorbens abhängen. Dies gilt zwar weitgehend für alle polaren Adsorbentien, aber doch nicht streng. Man kann mitunter ein anderes Grundmaterial finden, das infolge *spezifischer Affinitäten* mehr leistet als ein Aluminiumoxyd der entsprechenden Aktivität. Die folgende Zusammenstellung* über den *Einsatz der verschiedenen Adsorptionsmittel* gibt einige Hinweise:

1. Aluminiumoxyde: praktisch alles bis auf Anthrachinone und Flavone;
2. Kieselgele: Kohlenwasserstoffe, aliph. Alkohole, Carbonsäuren, ätherische Öle, Steroide
3. Magnesiumsilicat: Anthrachinone, Flavone, Glykoside, acetylierte Zucker, neutrale Steroide

* Erweiterte Fassung einer von G. WOHLLEBEN stammenden Übersicht.

4. Calciumphosphat:	Carotine, Nucleinsäuren, Proteine, Fermente;
5. Calciumoxyd, Calciumhydroxyd:	Carotinoide;
6. Zinkcarbonat:	Carotinoide, Dinitrophenylhydrazone, Naphthochinone;
7. Polyamide:	Flavone, isomere Chalkone, Anthrachinone, aromatische Nitroverbindungen, Dinitrophenylaminosäuren, (mehrkernige) Phenole, Gerbstoffe;
8. Cellulose, Zucker, Stärke:	Polyphenole, Chlorophylle, Xanthophylle

Auf die Sonderstellung von Aktivkohle wurde früher schon verwiesen. Sie erlaubt die Adsorptionsanalyse aus wäßrigem Medium. Zur Desaktivierung eignet sich Stearinsäure, als flüssige Phase nur polare Lösungsmittel. Besondere Einsatzgebiete sind: Zucker, Glykoside, organische Säuren, aromatische Stoffe[1], Terpene und makromolekulare organische Verbindungen.

Die Adsorption läßt sich auch durch Temperatursteigerung verringern. Dazu führt man bei unverändertem Spülmittelstrom einen elektrischen Ringofen mit Temperaturgradient die Säule abwärts und bringt damit die stationäre Anfangszone zum Fließen. Bei sehr uneinheitlichen Gemischen läßt man den Ofen mehrmals mit jeweils gesteigerter Temperatur über das Rohr wandern und kann so die Gemischbestandteile nacheinander heraustreiben[15].

Die Notwendigkeit, das Sorptionsmilieu so einzustellen und nötigenfalls laufend zu verändern, daß sich sorbierte mit gelöster Substanz im Gleichgewicht befindet, besteht bei allen Arten der chromatographischen Analyse, unabhängig vom Grundvorgang. Die Mittel, dies zu erreichen, sind aber verschieden. In Tab. 2 werden die wichtigsten Sorptionssysteme kurz charakterisiert und die zugehörigen Elutionsmittel angegeben.

In der 2. Horizontalspalte findet man den Anwendungsbereich, in der 3. und 4. die Ausgangsbedingungen der Analyse und in der letzten die Möglichkeit zur Abschwächung der Sorption, die das Chromatogramm „ins Fließen" bringt. Die Elutionsmittel sind immer nur sparsam zu verwenden und langsam in ihrer Konzentration zu steigern; am besten werden sie in einer Mischkammer allmählich dem Grundlösungsmittel zugesetzt. Erfolgt der „Durchbruch" der Substanzen schon ohne ihre Anwendung und bleibt die Trennung aus, so waren die Ausgangsbedingungen nicht richtig gewählt.

Aus der Tabelle geht auch hervor, daß der gleiche Füllkörper verschiedene Funktionen haben kann. Beispielsweise ist Aluminiumoxyd in unpolaren Lösungsmitteln als Adsorbens zu betrachten, in Wasser oder niederen Alkoholen aber als Ionenaustauscher. In diesem Falle kommt es entscheidend darauf an, ob seine Oberfläche basisch als Kationenaustauscher oder sauer als Anionenaustauscher präpariert ist. In einem

geeigneten binären Lösungsmittelgemisch kann es auch zum Träger der polaren Phase einer Verteilungsanalyse werden, die dann dementsprechend zu beeinflussen ist.

Die Blockierung der Austauschkapazitäten mit irgendeinem fest aufziehenden Stoff behindert die normale Adsorption nicht wesentlich. Hiervon wurde nach einem Vorschlag von BROCKMANN zum Anfärben des Sorbens mit fluorescierenden Farbstoffen Gebrauch gemacht[10]. Auf dem im UV-Licht leuchtenden Untergrund einer solchen Säule markieren sich viele sonst nicht sichtbaren Stoffe durch Löschung der Fluorescenz als dunkle Zonen.

Mitunter kann eine Säule ganz neue und sehr spezifische Eigenschaften annehmen, wenn man einen Hilfsstoff aufziehen läßt, der durch eine *umkehrbare chemische Reaktion* oder durch *Komplexbildung* die Analysensubstanzen vorübergehend bindet. Ersteres wurde zu einer eleganten Trennung von Ketonen ausgenutzt. Nach SJÖSTRÖM verwendet man dazu einen Anionenaustauscher in seiner Bisulfitform oder einen Kationenaustauscher, der mit Eisen(III)-ionen beladen ist[21]. Kohlenhydrate und mehrwertige Alkohole können in Gegenwart von Boraten an Aktivkohle[2] oder an Anionenaustauschern selektiv getrennt werden. In einer Reihe von Arbeiten hat besonders SANSONI[20] Austauschersäulen studiert, die mit Reduktionsmitteln (Dithionit, Boranat, Sulfit, Methylenblau u. a.) belegt sind. Im Bereich der Analyse organischer Verbindungen wurden solche „Elektronenaustauscher" besonders zur Abtrennung von Chinonen verwandt, die als Chinhydrone unter starker Farbvertiefung gebunden werden. In der Gasanalyse verwendet man Verteilungssäulen mit einem Zusatz von Silberverbindungen zur spezifischen Bindung von Olefinen.

Weiter ist man dazu übergegangen, spezifische Sorbentien für bestimmte Zwecke aufzubauen. Eine mit Dimethyl-amino-äthylgruppen substituierte Cellulose[17] eignet sich z. B. zur Trennung von Polysacchariden[16] unter milden Bedingungen, wobei zur fraktionierten Elution bereits kohlensaures Wasser ausreicht. Für die Papierchromatographie stehen entsprechende Spezialpapiere zur Verfügung.

Die *praktische Durchführung*[10] der Sorptionsanalyse ist bei allen besprochenen Varianten ungefähr gleich. Sie richtet sich aber nach der Zielsetzung. Als Methode zur qualitativen Analyse ist die *Papierchromatographie*, die als Adsorptions-, Ionenaustausch- und besonders Verteilungsverfahren angesetzt werden kann, der Säulenchromatographie gewöhnlich weit überlegen. Der Mengendurchsatz reicht von wenigen Mikrogramm bis zu etwa 0,1 g. Sie findet eine Ergänzung in der Methode von MOTTIER[14], die eine dünne Schicht Adsorbens zwischen 2 Glasplatten benutzt und von einer kleinen Bohrung in der oberen Platte aus ringförmige Chromatogramme entwickelt. Sie eignet sich besonders für

Tabelle 2. *Charakterisierung sorptionsanalytischer Systeme nach ihrer molekulartheoretischen Grundlage*

Grundlage	Adsorption	Wasserstoffbindung	Ionenaustausch	Verteilung	Einschlußverbindungen	Dialyse
Geeignet für:	Neutrale org. Molekeln, Säuren, Basen	Phenole (Flavone, Flavonole Chalkone) Nitroverbindungen organische Säuren	Säuren oder Basen; Aminosäuren	Alle Arten organischer Stoffe	Kleine anorg. oder org. Moleküle; unverzweigte Ketten	Abtrennung von Ionen oder kleinen Anteilen aus Eiweißstoffen. Trennung von Makromol. sehr verschiedener Dimensionen. Pufferwechsel
Festkörper:	Adsorptionsmittel [Kohle]	Polyamide (Perlon L)	Permutite, Harzaustauscher. Viele Aluminiumoxyde, Kieselgele und Aktivkohlen	Polystyrole, Polyäthylen; Flüssige Phasen aufgesaugt in Cellulose, Stärke Kieselgel, Kieselgur	Molekülsiebe, Harnstoff, bestimmte Silicate; Nickeldithiocyanat/org. Basen[11]	„Sephadex"* (vernetztes Dextran)
Lösungsmittel:	Unpolare und wenig polare [Für Kohle: Wasser, niedere Alkohole]	Wasser, Wasser-Methanol Wasser-Aceton	Polare bes. Wasser oder Alkohole; Pufferlösungen	Gemische aus wenigstens 2 Komponenten, die verschiedene Polarität haben	Polare oder unpolare, die nicht eingeschlossen werden	Wasser
Sorption steigt mit:	Molekulargewicht; Zahl der Doppelbindungen oder polaren Gruppen; Gesamtmoment; Polarisierbarkeit	H-Assoziation und Dipolmoment	Säure- bzw. Basenstärke	Löslichkeit in der ruhenden Phase	Übereinstimmung zwischen Molekeldimension und Gitterhohlräumen	je kleiner die wasserlöslichen Teilchen sind

Elutionsmittel:	Dimethylformamid (u. U. zusammen mit Eisessig/Wasser/Alkohol)	Ionen mit gleichem Ladungsvorzeichen, besonders $H^{\oplus}$ oder $OH^{\ominus}$; Puffer	Gute Lösungsmittel für die gesuchte Substanz	Lösungsmittel, die selbst Einschlußverbindungen geben	Die interessierenden Stoffe werden nicht sorbiert. Säule mit viel Wasser regenerierbar
Polare Lösungsmittel [Für Kohle: unpolare Lösungsmittel]					

* Auskunft und Literatur durch Pharmacia G.m.b.H., Bad Nauheim, Parkstr. 12.

Vorversuche zur Auswahl von Sorptions- und Lösungsmitteln. Weitere Verbreitung hat die *„Dünnschichtchromatographie"* von STAHL[22] gefunden, bei der mit etwas Gips gebundenes Kieselgel auf Glasplatten aufgetragen ist. Sie kann je nach dem Fließmittel als Adsorptions- oder Verteilungsverfahren benutzt werden und verfolgt ausschließlich analytische Ziele. An Schnelligkeit und Trennschärfe ist sie der Papierchromatographie überlegen und gibt auch neue Möglichkeiten der Indizierung, da man Reagentien wie Kaliumpermanganat oder konzentrierte Schwefelsäure anwenden kann.

Für präparative Ansätze hat sich die Trennsäule mit auf- oder absteigendem Lösungsmittelfluß behauptet. Das Fassungsvermögen liegt meist zwischen 0,01 g und 100 g, doch sind bei wertvollen Substanzen auch Ansätze in technischem Maßstab durchgeführt worden. Die *Belastbarkeit*, d.h. das Verhältnis der umsetzbaren Menge zum Gewicht des Sorptionsmittels schwankt zwischen 2% und 0,01‰, ist also sehr niedrig. Verteilungssäulen können mehrfach benutzt werden; Austauschersäulen lassen sich leicht regenerieren; Adsorptionssäulen aber sind nur einmal verwendbar, weil das Sorbens mit dem Elutionsmittel beladen hinterbleibt; höchstens durch Ausheizen kann man sie regenerieren. Der Lösungsmittelverbrauch ist bei Verteilungssäulen am höchsten, am geringsten bei Austauschersäulen; ebenso liegt es mit dem Zeitaufwand. Dafür haben aber Verteilungssäulen vergleichsweise die höchste Trennschärfe und universellste Verwendbarkeit.

Bemerkenswerterweise hat sich auch für genaue *quantitative Analysen* die Trennsäule nicht ersetzen lassen. Ihre höchste Durchbildung hat sie in den automatischen Anlagen zur Bestimmung der Aminosäuren nach MOORE und STEIN gefunden, die mit einem Austauschharz bei $\sim 0{,}1$‰ Belastung in Proben von wenigen Milligramm Eiweißhydrolysat fast alle Aminosäuren quantitativ erfassen[3].

Während *diastereomere* und *cis-trans-isomere Verbindungen* meist ohne Schwierigkeiten getrennt werden können, fehlt bis heute eine allgemein anwendbare Methode zur chromatographischen *Racemattrennung*. Es ist oft gezeigt worden, daß an optisch aktiven Sorptionsmitteln das Mengenverhältnis der Antipoden verschoben werden kann. Die Spaltung der Trögerschen Base an einem besonders präparierten Milchzucker[18] war der erste präparative Erfolg und konnte auf dl-2-Amino-2′-nitro-6,6′-ditolyl[7] übertragen werden. Dichloracetylderivate von rac. Aminosäuren sollen sich an Stärkesäulen bis auf 80—90% optische Reinheit bringen lassen[13]. Eine originelle „Fermentsäule" bauten GRUBHOFER u. SCHLEITH[9] auf, indem sie ein Polyaminostyrol diazotierten und mit Carboxypeptidase kuppelten. Sie spaltet Chloracetyl-dl-alanin in l-Alanin und Chloracetyl-d-alanin auf. Über die Trennung von rac. aromatischen Aminosäuren durch Papierchromatographie ist mehrfach berichtet worden[5]; wirksam ist hier die optisch aktive Cellulose als Adsorbens.

Kieselgel, das in Gegenwart einer bestimmten Substanz gefällt wird, behält eine „Vorliebe" für die Adsorption dieser Substanz[6]. Nach diesem Prinzip, das von PAULING vorgeschlagen wurde, konnten CURTI u. COLOMBO[4] bei rac. Camphercarbonsäure eine chromatographische Anreicherung der d-Form von 30% erreichen, aber ein reiner Antipode wurde nicht erhalten.

Unbefriedigend gelöst ist bisher auch die *Fraktionierung makromolekularer Stoffe*. Gesetzmäßige Verschiebungen des mittleren Molekulargewichts aufeinanderfolgender Fraktionen wurden an Kohle, Stärke, Celite u. a. mehrfach erreicht, jedoch keine so sauberen Trennungen wie etwa mit der Ultrazentrifuge. Einen gewissen Fortschritt für wasserlösliche Substanzen dieser Art scheint die Filtration durch vernetzte Dextran-gele („Sephadex"*) zu bringen[12]. Diese schließen Wasser ein, das für große Moleküle in der vorbeiströmenden Lösung unzugänglich ist, nicht so für kleine. Das auswählende Prinzip ist also eine Dialyse; im Durchlauf sind die größten Moleküle angereichert. Beispielsweise wurde an Sephadex G-75 eine vollständige Trennung von Hämoglobin (Mg 70000) und Myoglobin (Mg 17000) erreicht. Die Säule kann durch gründliches Wässern regeneriert werden.

Die weitere Entwicklung der Chromatographie dürfte in der Auffindung neuer spezifischer Sorptionsmittel und von Methoden zur fortlaufenden Aufzeichnung der Durchlaufkonzentration zu suchen sein; letzteres Problem ist ja in der Gaschromatographie längst gelöst.

Zusammenfassung

Die Anlage und Durchführung einer Sorptionsanalyse richtet sich nach der vorherrschenden Grunderscheinung. Dementsprechend müssen

* Auskunft und Literatur durch Pharmacia G.m.b.H., Bad Nauheim, Parkstr. 12.

die feste und flüssige Phase ausgesucht und aufeinander abgestimmt werden (Tabellen). Komplexbildende Zusätze oder Hilfsstoffe können die Spezifität wesentlich verbessern. Auf die geeignetste Ausführungsform bei qualitativer oder quantitativer Analyse bzw. präparativen Ansätzen wird kurz eingegangen. Die Möglichkeiten zur Racemattrennung und zur Fraktionierung makromolekularer Stoffe sowie Fermentsäulen und reduzierende Säulen werden kurz besprochen.

Literatur

[1] Asatoor, A., u. C. E. Dalgliesh: J. chem. Soc. (London) **1956**, 2291; **1958**, 1498. — [2] Barker, S. A., E. I. Bourne u. O. Theander: J. chem. Soc. (London) **1955**, 4276. — [3] Braunitzer, G.: Angew. Chem. **72**, 485 (1960). — [4] Curti, R., u. U. Colombo: J. Amer. chem. Soc. **74**, 3961 (1952). — [5] Dalgliesh, C. E.: J. chem. Soc. (London) **1952**, 3940. — Klingmüller, V., u. L. Maier-Sihle: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **308**, 49 (1957); vgl. diese Z. **162**, 462 (1958). — [6] Dickey, F. H.: Proc. Nat. Acad. Sci. **35**, 229 (1949). — [7] Di Modica, G., u. E. Angeletti: Ricerca sci. **22**, 715 (1952); vgl. Chem. Abstr. **47**, 6918-d (1953). — [8] Endres, H., W. Grassmann u. M. Oppelt: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **317**, 21 (1959). — [9] Grubhofer, N., u. L. Schleith: Naturwissenschaften **40**, 508 (1953); vgl. diese Z. **142**, 64 (1954). — Grubhofer, N., u. L. Schleith: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **296**, 262 (1954). — Reese, E. T., u. M. Mandels: J. Amer. chem. Soc. **80**, 4625 (1958). — [10] Hesse, G.: in Houben-Weyl: Methoden der org. Chemie, Bd. I/1, S. 469. G. Thieme: Stuttgart. — [11] Kemula, W., u. D. Sybitzka: Nature (London) **185**, 237 (1960); Angew. Chem. **72**, 354 (1960). — [12] Lathe, G. H., u. C. R. J. Ruthven: Biochemic. J. **62**, 665 (1956). — Porath, J., u. P. Flodin: Nature (London) **183**, 1657 (1959). — Porath, J.: Clin. chim. Acta **4**, Heft 6 (1959). — [13] Lautsch, W., u. D. Heinicke: Kolloid-Z. **154**, 1 (1957). — [14] Mottier, M., u. M. Potterat: Mitt. Gebiete Lebensmittelunters. Hyg. (Bern) **43**, 118, 123, (1952); **44**, 293 (1953). — Mottier, H.: Mitt. Gebiete Lebensmittelunters. Hyg. (Bern) **49**, 454 (1958); vgl. diese Z. **174**, 319 (1960). — [15] Nerheim, A. G.: Analyt. Chemistry **32**, 436 (1960); Angew. Chem. **72**, 597 (1960); vgl. diese Z. **178**, 125 (1960). — [16] Neukorn, H., H. Deuel, W. J. Heri u. W. Kündig: Helv. chim. Acta **43**, 64 (1960). — [17] Peterson, E. A., u. H. A. Sober: J. Amer. chem. Soc. **78**, 751 (1956). — [18] Prelog, V., u. P. Wieland: Helv. chim. Acta **27**, 1127 (1944). — [19] Roscher, G.: Diss. Erlangen 1959. — [20] Sansoni, B.: Angew. Chem. **66**, 143 (1954). — Sansoni, B., u. K. Dorfner: Angew. Chem. **71**, 160 (1959). — [21] Sjöström, E., u. Mitarb.: Svensk kem. Tidskr. **64**, 301 (1952); Acta polytechn. (Stockholm) **1954**, Heft 144; Angew. Chem. **66**, 689 (1954); vgl. diese Z. **140**, 74 (1953). — [22] Stahl, E.: Pharmazie **11**, 633 (1956); Angew. Chem. **69**, 512 (1957); Chemiker-Ztg. **82**, 323 (1958); Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. **292/64**, 411 (1959). — [23] Zechmeister, L., u. A. Polgár: J. Amer. chem. Soc. **66**, 137 (1944).

Prof. Dr. G. Hesse, Institut für Organische Chemie der Universität Erlangen, Fahrstraße 17

Max Planck-Institut für Biochemie, München

Neuere Entwicklungen und Ergebnisse der Substanztrennung durch multiplikative Verteilung

Von
ERICH HECKER

Mit 10 Textabbildungen

(Eingegangen am 4. November 1960)

Die große Zahl der heute bekannten Trennverfahren läßt sich je nach Art der ausgenützten Effekte im wesentlichen zu zwei Gruppen zusammenfassen, nämlich

1. Verfahren, die auf kinetischen Effekten, wie der Wanderungsgeschwindigkeit von Ionen im elektrischen Feld, der Diffusionsgeschwindigkeit u. a. m., beruhen, und

2. Verfahren, die auf Phasengleichgewichte, wie das Dampfdruck-, das Löslichkeits-, das Verteilungsgleichgewicht u. a. m., zurückgehen.

Tabelle 1
Der Einzeleffekt und seine Vervielfachung bei einigen wichtigen Trennverfahren[17]

	Einzeleffekt	Multiplikatives Trennverfahren
Kinetische Effekte	Wanderungsgeschwindigkeit von Ionen	Elektrophorese
	Diffusionsgeschwindigkeit durch Membranen	Dialyse
	Verdampfungsgeschwindigkeit	Kurzwegdestillation
	Sedimentationsgeschwindigkeit	Ultrazentrifugation
Phasengleichgewichte	Dampfdruck	Destillation
	Löslichkeit	Fraktionierte Kristallisation Zonenschmelzen
	Adsorptionskoeffizient	Adsorptionschromatographie
	Ionenaustauschkoeffizient	Austauscherchromatographie
	Verteilungskoeffizient (fest-flüssig)	Verteilungschromatographie
	Verteilungskoeffizient (flüssig-flüssig)	Multiplikative Verteilung
	Verteilungskoeffizient (gasförmig-flüssig)	Gaschromatographie Extraktive Destillation

Aber nur in den einfachsten Fällen sind die Unterschiede der Substanzen in bezug auf eine bestimmte physikalische Konstante so groß,

daß schon der Einzeleffekt — also etwa eine einzige Gleichgewichtseinstellung — zur vollständigen Trennung genügt: Meist ist es erforderlich, die Einzeleffekte in geeigneter Weise zu vervielfachen. Bei Verfahren, die auf Phasengleichgewichten beruhen, wird dies dadurch erreicht, daß man eine oder beide Phasen senkrecht zur Richtung des Stoffaustausches strömen läßt. Dieses zuerst von KUHN benannte *Multiplikationsprinzip* wird in geeigneten Apparaturen wie Kolonnen, Säulen oder Batterien verwirklicht.

Besonders übersichtliche Beispiele für die Bedeutung des Einzeleffekts und die Realisierungsmöglichkeiten des Multiplikationsprinzips geben die multiplikativen Verteilungsverfahren, über deren neuere Ergebnisse und Probleme ich berichten möchte. Der Kürze halber sollen hier nur die Entwicklungstendenzen im Hinblick auf die Verteilung organischer Verbindungen behandelt werden, obwohl in der Anwendung der Verfahren auf anorganische Substanzen eine exponentielle Entwicklung zu verzeichnen ist, die im Zusammenhang mit Analytik und Technologie radioaktiver Elemente steht.

Den Einzeleffekt der Verteilung beschreibt der Nernstsche Verteilungssatz durch den Verteilungskoeffizienten K

$$K = \frac{C_l}{C_s} \text{ oder } C_l = K \cdot C_s \quad (1); \; G = K \cdot V. \qquad (2)$$

Gl. (1) besagt, daß einer gegebenen Substanz im Gleichgewicht mit zwei flüssigen und nur begrenzt mischbaren Phasen ein konstanter Verteilungskoeffizient K zukommt, der nur von Druck und Temperatur, im Idealfall aber nicht von der Gesamtmenge der Substanz abhängt. Trägt man die Konzentration C_l und C_s in den beiden Phasen gegeneinander auf, so erhält man eine Gerade mit dem Anstieg K, die als Verteilungsisotherme bezeichnet wird. Als Beispiel ist in Abb. 1 die Verteilungsisotherme des 3,5-Dinitrobenzoesäure-n-octylesters im System Cyclohexan-Methanol-Wasser (20:20:1) wiedergegeben. Häufig ist es zweckmäßig, statt des Verteilungskoeffizienten K die Verteilungszahl G zu verwenden, die mit K durch das Volumenverhältnis $V = V_l/V_s$ verknüpft ist (Gl. 2).

Die einfachste Form der multiplikativen Verteilung ist im Prinzip schon lange bekannt. Das Verfahren ist aber erst 1944 von CRAIG in das Laboratorium eingeführt worden[10,18a] und hat zunächst die irreführende Bezeichnung counter current distribution — Gegenstromverteilung — erhalten. Der entscheidende Schritt zur Routinemethode war eine ebenso einfache wie geniale mechanische Anordnung, die es gestattet, zahlreiche Gleichgewichtseinstellungen und Phasentransporte in Verteilungsbatterien halbautomatisch auszuführen. Heute sind diese Batterien fast in jedem Laboratorium anzutreffen.

Das Prinzip des Verfahrens — das man heute allgemein als Craig-Verteilung bezeichnet[18a] — darf als bekannt vorausgesetzt werden. Sein besonderer Vorteil ist, daß man die experimentell gewonnenen Verteilungskurven berechnen kann, wenn die verteilte Substanz eine lineare Verteilungsisotherme besitzt. In den meisten Fällen gelingt es, diese Voraussetzung durch Wahl geeigneter Lösungsmittelsysteme über einen ziemlich großen Konzentrationsbereich hinweg zu erfüllen. Deckt sich eine berechnete Verteilungskurve mit der experimentell erhaltenen, so darf man mit hoher Wahrscheinlichkeit annehmen, daß eine reine Substanz vorliegt. Abweichungen von der berechneten Verteilungskurve weisen fast immer auf das Vorliegen eines Gemisches hin. Auf Grund dieser Möglichkeit ist die Craig-Verteilung in zahllosen Fällen zur Reinheitsprüfung herangezogen worden[18a]. Aktuelle Anwendungsbeispiele entnehmen wir aus dem Bereich der radioaktiven Verdünnungsanalyse und der Analyse von Polymeren.

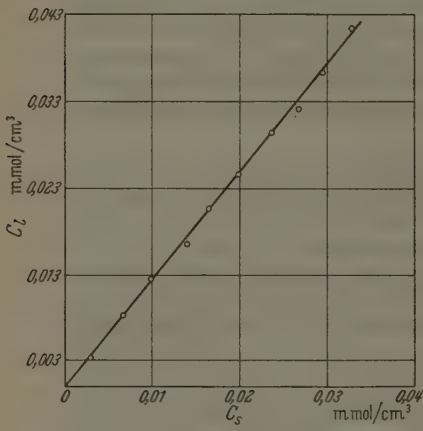


Abb. 1. Verteilungsisotherme des 3,5-Dinitrobenzoesäure-n-octylesters bei Raumtemperatur[18b], weitere Erläuterungen im Text

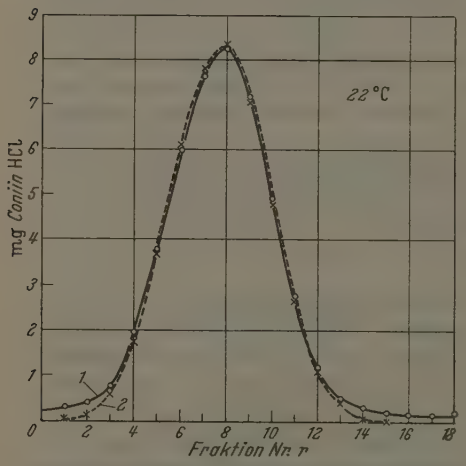


Abb. 2. Craig-Verteilung radioaktiven Coniinhydrochlorids, $V = 2{,}0$. *1* experimentell gewonnene Kurve; *2* für $G = 0{,}76$ berechnete Kurve. Die spezifische Aktivität der Fraktionen 4. 6. 8, 9. 11 sind in 10^3 Imp./min/mg 4,0, 4,5, 4,2, 4,3, 4,5

Bei der Untersuchung von Stoffwechselsequenzen radioaktiv markierter Verbindungen fügt man das zu erwartende Reaktionsprodukt dem Ansatz in nicht markierter Form als Trägersubstanz zu und isoliert es nach Ablauf der Reaktion wieder. Enthält nun die isolierte Verbindung Radioaktivität, so darf man schließen, daß sie in der Reaktion als Folgeprodukt des radioaktiven

Ausgangsmaterials auftritt. Voraussetzung dabei ist, daß man mit einer an Sicherheit grenzenden Wahrscheinlichkeit zeigen kann, daß die Radioaktivität des isolierten Trägermaterials nicht auf Verunreinigungen zurückzuführen ist.

So konnte Höss[24] an unserem Institut im Rahmen von Versuchen zur Biosynthese des Coniins, dem Hauptalkaloid des gefleckten Schierlings, zeigen, daß man nach Injektion von ^{14}C-markiertem Lysin in die junge Pflanze radioaktive Coniinpräparate isolieren kann. Das Ergebnis einer Craig-Verteilung des isolierten Coniinhydrochlorids im System 2-Butanol-Wasser über $n = 18$ Verteilungsschritte zeigt Abb. 2. Die für eine Verteilungszahl $G = 0{,}76$ berechnete und gestrichelt eingezeichnete Kurve stimmt sehr gut mit der experimentell gewonnenen überein. Das spricht für die chemische Einheitlichkeit des in den Fraktionen enthaltenen Materials. Zusätzlich haben wir auch die spezifischen Aktivitäten einzelner Fraktionen links und rechts des Maximums bestimmt und gefunden, daß sie innerhalb der Fehlergrenze der Zählmethode konstant sind. Damit ist auch die radiochemische Einheitlichkeit der Substanz gesichert, und wir dürfen aus dem Befund schließen, daß Lysin eine Vorstufe des Coniins bei der Biosynthese im Schierling darstellt.

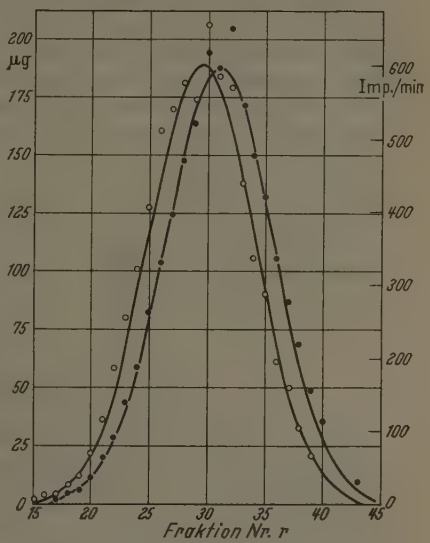


Abb. 3. Craig-Verteilung eines Gemisches aus Testosteron-[4-^{14}C] und Oestron. Die ausgezogenen Kurven sind berechnet. Erläuterungen im Text

Die hohe Empfindlichkeit der Methode geht aus einem der Steroidchemie entnommenen Beispiel hervor[5]. Man unterwirft ein Gemisch aus je etwa 1 mg Testosteron-[4-^{14}C] und nicht markiertem Oestron einer $n = 45$fachen Craig-Verteilung (Abb. 3). Der Gehalt der einzelnen Fraktionen an Oestron kann fluorimetrisch (im Bild als Ringe dargestellt), der an Testosteron durch Zählen der Radioaktivität bestimmt werden. Man erhält auf diese Weise Verteilungskurven, aus deren Maxima sich für Oestron ein Verteilungskoeffizient von $K = 0{,}424$ und für Testosteron ein solcher von $K = 0{,}456$ errechnet. Obwohl die Verteilungskoeffizienten nur geringfügig verschieden sind, läßt sich mit Sicherheit

aussagen, daß hier zwei verschiedene Substanzen vorliegen müssen, entsprechend den beiden Verteilungskurven. Das Bild wird abgerundet durch die Bestimmung der spezifischen Aktivität der einzelnen Fraktionen. Diese zeigen einen starken Gang von links nach rechts und sind keineswegs konstant, womit auch die radiochemische Uneinheitlichkeit der Fraktionen demonstriert ist.

Synthetische makromolekulare Stoffe sind bekanntlich polymolekular, und auch eine sehr trennscharfe oder wiederholte Fraktionierung wird kaum Produkte von einem einheitlichen Polymerisationsgrad liefern können. Man hat früher geglaubt, solche Stoffe durch Angabe eines mittleren, etwa viscosimetrisch bestimmten Molekulargewichts charakterisieren zu können. Dieses Verfahren ist aber unzulänglich und kann zu Fehlurteilen führen, da bei gleichem mittlerem Molekulargewicht

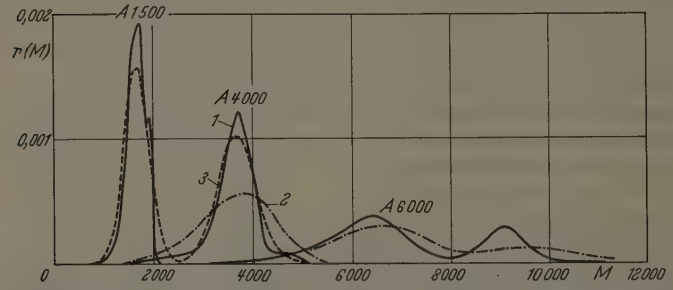


Abb. 4. Häufigkeitsverteilung der Molgewichte für drei Polyglykolpräparate. *1* im System Trichloräthylen-Chloroform-Wasser, *2* im System Trichloräthylen-Alkohol-Wasser, *3* nach der Theorie von FLORY[4]

die Zusammensetzung aus Anteilen verschiedenen Molekulargewichts und damit auch die physikalischen und technologischen Eigenschaften völlig verschieden sein können. Zur ausreichenden Charakterisierung eines polymolekularen Stoffes ist daher die Angabe der Häufigkeitsverteilung der Polymerisationsgrade erforderlich. Besonders geeignet zu deren Ermittlung sind Fraktionierungsmethoden, die diese Verteilung unmittelbar oder nach einer exakt begründbaren Umrechnung liefern. ALMIN u. Mitarb.[4] haben kürzlich in einer sorgfältigen Studie gezeigt, daß die Anwendung der Craig-Verteilung gegenüber den bisher gebräuchlichen Fraktionierungsmethoden, wie Diffusion, Ultrazentrifugierung oder stufenweise Extraktion bei extremen Volumenverhältnissen der Phasen, erhebliche Vorteile bringt. Voraussetzung ist natürlich, daß sich ein zur Verteilung geeignetes Lösungsmittelsystem auffinden läßt, worauf später noch einzugehen sein wird.

Die Craig-Verteilung eines Polymeren liefert eine Massenverteilung, die sich durch ihre leichte Reproduzierbarkeit auszeichnet. Für vergleichende

Untersuchungen, wie sie z. B. zur Betriebskontrolle erforderlich sind, geben bereits diese Kurven alle erforderlichen Informationen. In einem gegebenen Lösungsmittelsystem ist aber auch die Beziehung zwischen Polymerisationsgrad und Verteilungskoeffizient festgelegt. Sie braucht nur einmal zahlenmäßig bestimmt zu werden und kann dann zur Umrechnung in die Häufigkeitsverteilung der Polymerisationsgrade herangezogen werden. Auf diese Weise ermittelte Häufigkeitsverteilungskurven für drei Sorten von Polyglykolen mit mittleren Molekulargewichten A von 1500, 4000 und 6000 sind in Abb. 4 wiedergegeben. Die Übereinstimmung zwischen der experimentell ermittelten Häufigkeitsverteilung der Molekulargewichte und der für A 1500 und A 4000 nach der kinetischen Theorie von FLORY berechneten ist sehr gut. Man beachte die Aufspaltung der Sorte A 6000 in 2 Maxima, die bei Molekulargewichten zwischen 6500 und 7000 sowie 9000 und 9500 liegen.

Wenn auch bei analytischen Problemen eine quantitative Trennung nicht immer erforderlich ist, so wird sie bei der Reindarstellung von Substanzen gewünscht, und man fragt sich nach dem dazu notwendigen Aufwand an Verteilungsschritten. Dieser wird wesentlich bestimmt vom Trennfaktor β der Substanzen, d. h. vom Verhältnis ihrer Verteilungskoeffizienten bzw. Verteilungszahlen (Gl. 3).

$$\beta = \frac{G_A}{G_B} = \frac{K_A}{K_B} \geqq 1. \tag{3}$$

Bei $\beta = 1$ wird $K_A = K_B$ und die Trennung der Substanzen in dem verwendeten Phasenpaar ist unmöglich. Wie man leicht ausrechnen kann, liefert die einmalige Verteilung eines Gemisches zweier Substanzen mit dem Trennfaktor $\beta = 100$ die beiden Verbindungen in einer Reinheit von 90% in der Ober- bzw. in der Unterphase. Als Faustregel gilt daher, daß bei $\beta < 100$ der Einzeleffekt vervielfacht werden muß, wenn man zu praktisch brauchbaren Trennungen kommen will. Den quantitativen Zusammenhang zwischen der zur Trennung erforderlichen Zahl von Verteilungsschritten n und dem Trennfaktor β gibt die Trennfunktion des Verfahrens[19] an. Man erkennt aus den Kurven (Abb. 5), daß die Zahl n der Verteilungsschritte mit kleiner werdendem Trennfaktor und hoher Ausbeute an reiner Substanz rasch ansteigt.

Verteilungen mit 100 und mehr Verteilungsschritten sind heute üblich und können ohne weiteres mit den von CRAIG 1951[11] bzw. von v. METZSCH 1953[33] beschriebenen vollautomatischen Verteilungsbatterien ausgeführt werden. Zur Reinigung des Corticotropins A[6], eines Peptidhormons aus der Hypophyse, wurden z. B. Verteilungen mit bis zu 10000 Verteilungsschritten ausgeführt. Die apparative Seite der Craig-Verteilung hat damit eine gewisse Vollkommenheit erreicht. Dafür sind auf dem Gebiet der Lösungsmittelauswahl der Experimentierkunst keine

Grenzen gesetzt, obwohl zur Craig-Verteilung geeignete Phasenpaare heute für alle Stoffklassen bekannt sind[18a].

Der Trennfaktor hängt von der chemischen Konstitution der zu trennenden Verbindungen und von der Zusammensetzung des Lösungsmittelsystems ab. Mit besonders kleinen Trennfaktoren hat man naturgemäß bei Verbindungen zu rechnen, die sich chemisch sehr nahe stehen. Um so bemerkenswerter sind Versuche von SCHÖNENBERGER[36], der im System 2% wäßriger Salzsäure-Methanol-Chloroform (28:12:40) ein Phasenpaar aufgefunden hat, das die Meso- und die Racemform des N,N'-

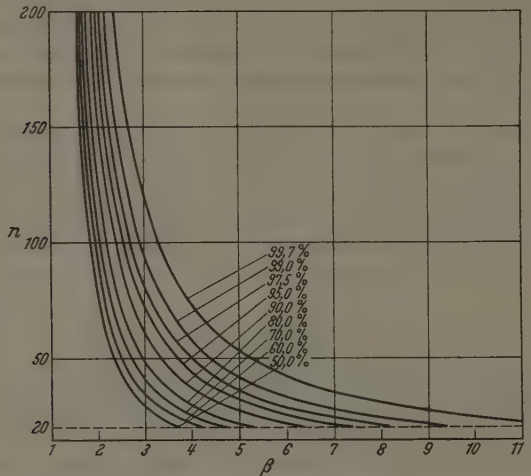


Abb. 5. Die vereinfachte Trennfunktion der Craig-Verteilung (Grundprozeß). Die %-Zahlen geben die Ausbeute an reiner Substanz an[19]

Dibutyl-α,α'-diphenyl-äthylen-diamindihydrochlorids bereits mit $n = 24$ Verteilungsschritten quantitativ zu trennen gestattet (Abb. 6). Die Racemform ist in der Abbildung als Komponente A, die Mesoform als Komponente B bezeichnet. Dagegen mußten KENNER u. Mitarb.[27] $n = 900$ Verteilungsschritte aufwenden, um zwei diastereomere Tetrapeptide partiell zu trennen.

Besondere Probleme hinsichtlich der Lösungsmittelauswahl stellt die Verteilung hochmolekularer Substanzen. Hier gilt es zunächst, Lösungsmittel zu finden, in denen sich die Verbindungen in genügender Menge lösen und die brauchbare, d. h. weder zu kleine noch zu große Verteilungskoeffizienten liefern. HAMANN u. Mitarb.[14] konnten zeigen, daß das System Decan-Benzol/Nitromethan-Dimethylformamid sich dazu eignet, Gemische aus Polystyrol und Copolymerisaten aus Styrol und Fumar-

säure bzw. Maleinsäure durch Craig-Verteilung mit etwa 30 Verteilungsschritten zu trennen. Auch zur Verteilung von Polyglykolen geeignete Systeme sind kürzlich beschrieben worden[4]. Für die Zusammenstellung solcher Systeme gelten Regeln, die am Beispiel der Verteilung von Peptiden und Proteinen diskutiert werden sollen. Gegenüber den technisch hergestellten Hochmolekularen sind Peptide und Proteine ausgezeichnet durch ihre biologische Wirksamkeit. Diese kann mehr oder weniger leicht durch äußere Einwirkungen — meist irreversibel — verlorengehen, ohne daß sich die Bruttozusammensetzung des Moleküls dabei verändert. Man bezeichnet diesen Vorgang, der oft zur Ausfällung führt, als Denaturierung und weiß, daß sie unter anderem dann eintritt, wenn das Medium

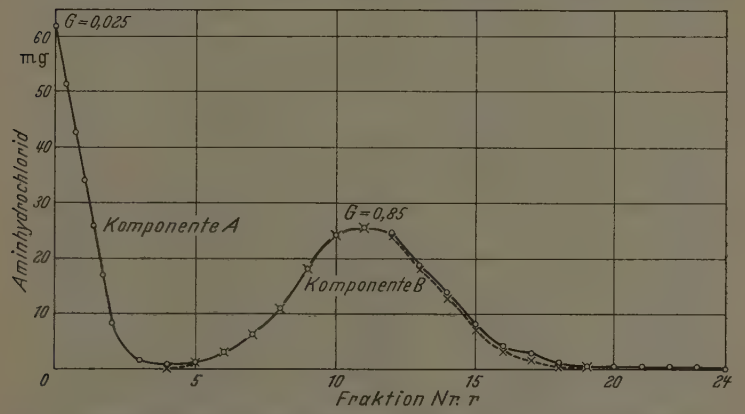


Abb. 6. Trennung der Meso- und Racemform des N,N'-Dibutyl-α,α'-diphenyl-äthylendiamins. 2 HCl durch Craig-Verteilung[36], $V = 1{,}6$; weitere Erläuterungen im Text

dazu geeignet ist, Wasserstoff- und Salzbrückenbindungen zu lösen. Dies kann aber gerade durch organische Lösungsmittel und Lösungen von Salzen geschehen; es sind Proteine bekannt, die bereits beim Schütteln durch die Berührung mit den Phasengrenzflächen denaturieren. Zur Verteilung von Peptiden und Proteinen brauchbare Phasenpaare dürfen aber weder bei der Verteilung noch bei der späteren Rückgewinnung zu Denaturierungen Anlaß geben.

Zur Verteilung von Oligo- und Polypeptiden geeignete Systeme sind erstmals 1952 zur Reindarstellung von Insulin[15] mit Erfolg angewendet worden. Die Systeme bestehen aus Butanol als Oberphase und wäßrigen Unterphasen, die Essigsäure, Di- oder Trichloressigsäure oder p-Toluolsulfonsäure enthalten. Diese Säuren bilden mit Peptiden reversibel Komplexe, die die Butanolphase stärker bevorzugen als die freien Peptide.

Tabelle 2. *Lösungsmittelsysteme zur Verteilung von Peptiden*
(Erläuterungen im Text)

	Substanz	Zahl der Aminosäuren (Molgew.)	Lösungsmittelsystem	K	β	$n_{97,5\%}$*	Autoren
Oligopeptide	Lysin-vasopressin (Rind)	9 (1083)	n-Butanol-0,09 m p-Toluolsulfonsäure	1,25	1,9	240	DuVigneaud 1952[37a,b]
	Arginin-vasopressin (Schwein)	9 (1111)		0,66			DuVigneaud 1952[37a,b]
Polypeptide	Glutaminsäure-melanotropin (Schwein)	18 (2177)	2-Butanol-0,5% wäßrige Trichloressigsäure	0,60	1,2	3000	Li u. Mitarb. 1957[12,31a]
	Serin-melanotropin (Rind)	18 (2135)		0,52			Li u. Mitarb. 1957[13,31a]
	Leucin-corticotropin (A) (Schwein)	39 (4566)	2-Butanol-0,2% wäßrige Trichloressigsäure	1,82	2,5	106	White 1953[38]
	Serin-corticotropin (α) (Schaf)	39 (4541)		0,72			Li u. Mitarb. 1955[32], vgl. auch [6]
	Leucin-corticotropin (A) (Schwein)	39 (4566)	n-Butanol-6% Eisessig in 3,5% wäßrige NaCl-Lösung	0,95	> 9,5	< 20	Bell 1954[6]
	Serin-corticotropin (α) (Schaf)	39 (4541)		< 0,1			Li 1956[31b]

* nach [19].

Die Phasenpaare sind ferner dadurch gekennzeichnet, daß ihre Zusammensetzung recht nahe am kritischen Mischungspunkt liegt. Auf diese Weise wird ein hoher Wassergehalt der Oberphase erreicht, der das Eintreten der Peptide in die Butanolphase erleichtert und die Gefahr der Denaturierung durch Dehydratisierung herabsetzt. Der starken Temperaturabhängigkeit der Zusammensetzung der Phasen trägt man durch Arbeiten bei konstanter Temperatur Rechnung.

Solche Lösungsmittelsysteme (Tab. 2) zeigen oft eine hohe Selektivität. So konnte WHITE[38] aus Schweinehypophysen das Peptidhormon Leucin-corticotropin oder Corticotropin A mit einem Molekulargewicht von M = 4566 isolieren. Es enthält 39 Aminosäuren, und zwar dieselben 38, die auch im Corticotropin α aus Hypophysen von Schafen[32] enthalten sind. Als 39. Aminosäure ist aber im Corticotropin A Leucin, im Corticotropin α dagegen Serin enthalten. Obwohl diese Unterschiede relativ gering erscheinen, geben die beiden Polypeptide im System 2-Butanol-0,2% wäßrige Trichloressigsäure einen Trennfaktor von $\beta = 2{,}5$ und im System n-Butanol/6% Essigsäure in 3,5% wäßriger NaCl sogar einen Trennfaktor von $\beta > 9{,}5$. Die zur Gewinnung von 97,5% reinen Substanzen erforderliche Zahl der Verteilungsschritte ist in Tab. 2 ebenfalls angegeben. Ähnliche Effekte werden auch für die in der Tabelle aufgeführten Oligopeptide Lysin-Vasopressin und Arginin-Vasopressin gefunden, die sich nur durch den Lysin- bzw. Argiringehalt unterscheiden und die im System n-Butanol-0,09 m p-Toluolsulfonsäure[37] einen Trennfaktor von $\beta = 1{,}9$ aufweisen. Für die Melanotropine[12,13], die sich nur durch Serin- bzw. Glutaminsäuregehalt unterscheiden, ist dagegen der Trennfaktor in dem angegebenen System recht klein. Die Anwendung solcher und ähnlicher Lösungsmittelsysteme hat in den letzten Jahren die Reindarstellung und die Konstitutionsermittlung einer ganzen Anzahl von bis dahin nur ihrer biologischen Wirkung nach bekannten Peptidhormonen ermöglicht.

Die Entwicklung geht nun dahin, auch Makropeptide bzw. Proteine sowie Nucleinsäuren auf ähnliche Weise zu reinigen. Die Darstellung einheitlicher Proteine durch Kristallisation hat sich als höchst problematisch erwiesen und wird durch multiplikative Verfahren ersetzt. Die Verteilung ist dabei den ionenaustausch- und adsorptionschromatographischen Methoden oft überlegen, da bei den letzten meist eine irreversible Adsorption eines Teiles der hochmolekularen Substanz an der Säulenfüllung beobachtet wird.

Die multiplikative Verteilung von Proteinen ist bisher mit Erfolg gelungen bei Ribonuclease[28], Lysozym[9,28], Prolactin[31], Globin[23] und Serumalbumin[16] in den Systemen, die in Tab. 3 zusammengestellt sind. Das Hauptproblem bei solchen Verteilungen ist die im Vergleich zu den Peptiden noch größere Neigung der Proteine zur Denaturierung. Um die Versuchsbedingungen in den bereits für Peptide bewährten Systemen

Tabelle 3. *Lösungsmittelsysteme zur Verteilung von Proteinen* (Erläuterungen im Text)

	Substanz	Zahl der Aminosäuren (Molgew.)	Lösungsmittelsysteme	K	β	$n_{97,5\%}$*	Autoren
Makropeptide (Proteine)	Ribonuclease	124 (13683)	C_2H_5OH, H_2O, $(NH_4)_2SO_4$ (25,9 : 57,6 : 16,5 Gew.)	0,8	—	—	KING u. CRAIG 1958[28]
	Lysozym	~ 130 (~ 15000)	C_2H_5OH, H_2O, $(NH_4)_2SO_4$ (25,9 : 57,6 : 16,5 Gew.)	0,63	—	—	KING u. CRAIG 1958[9,28]
	Prolactin	211 (24100)	2-Butanol-0,35% wäßrige Dichloressigsäure Saccharose-Butylcellosolve Wasser (2 : 3 : 5)	1,25	—	—	LI 1957[31a]
	Globin	~ 300 (~ 31700)	2-Butanol-1% wäßrige Dichloressigsäure	0,47** 3,31	7,1	24	HILL u. CRAIG 1959[23]
	Serumalbumin	~ 630 (68000)	2-Butanol-0,1% wäßrige Trichloressigsäure	0,86	—	—	HAUSMANN u. CRAIG 1958[16]

* nach [19]. ** Globin spaltet in 2 Makropeptide auf, die mit α ($G = 0{,}47$) und β bezeichnet werden.

noch weiter zu verbessern, kann man die Verteilung bei tiefen Temperaturen und in Gegenwart von gewissen Stabilisatoren, wie dem Natriumsalz des Acetyltryptophans oder der Caprylsäure, ausführen. HAUSMANN u. CRAIG ist es kürzlich gelungen, menschliches Serumalbumin mit einem Molekulargewicht von 68000 einer $n = 401$ fachen Verteilung im System 2-Butanol-0,1% Trichloressigsäure in 0,01 m wäßriger Essigsäure und Äthanol (25 : 25 : 1) zu unterwerfen[15] (Abb. 7). Es hat sich dabei gezeigt, daß das durch Ultrazentrifugierung vorgereinigte Präparat neben dem Hauptprodukt mit $K = 0{,}857$ noch mindestens vier weitere Komponenten enthält. Die Hauptbande in den Fraktionen 160—220 konnte durch Dialyse gegen das Natriumsalz des Acetyltryptophans bei 4°C unverändert zurückgewonnen werden, wie immunologisch, elektrophoretisch und durch die Farbstoffbindungsreaktion gezeigt wurde.

Demgegenüber steckt die Verteilung von Ribonucleinsäuren noch in den Anfängen. Immerhin ist es HOLLEY u. Mitarb.[25] gelungen, aus der an der Proteinbiosynthese beteiligten löslichen Ribonucleinsäure der

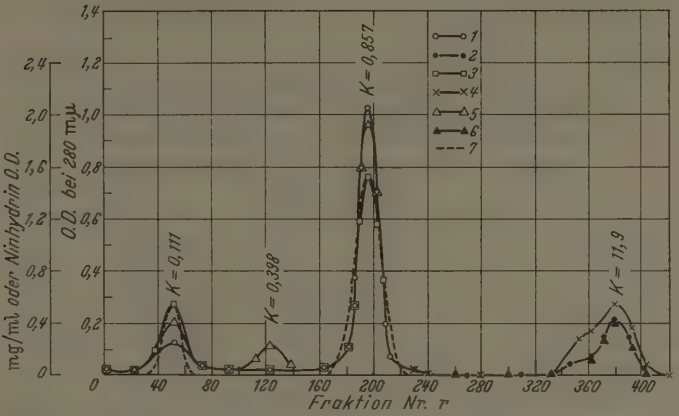


Abb. 7. Reinigung von Serumalbumin durch Craig-Verteilung[16], *1* Ninhydrin Unterphase, *2* Ninhydrin Oberphase, *3* 280 mμ Unterphase, *4* 280 mμ Oberphase, *5* mg/ml Unterphase, *6* mg/ml Oberphase, *7* berechnet. Weitere Erläuterungen im Text

Rattenleber durch mehrfache Craig-Verteilung, zuletzt über $n = 250$ Verteilungsschritte, die alaninaktive Ribonucleinsäure nahezu quantitativ abzutrennen. Die Rückisolierung des biologisch aktiven Materials ist bisher allerdings nur mit Aktivitätsverlusten möglich. KIRBY[29] konnte

Tabelle 4. *Kombinationen von Polymeren, die mit Wasser zweiphasige Systeme ergeben*[1]

Polyäthylenglykol	—	Polypropylenglykol
Polyäthylenglykol	—	Polyvinylalkohol
Polyäthylenglykol	—	Polyvinylpyrrolidon
Polyäthylenglykol	—	Dextran
Polypropylenglykol	—	Polyvinylpyrrolidon
Polypropylenglykol	—	Dextran
Polyvinylalkohol	—	Dextran
Dextran	—	Methylcellulose
Dextran	—	Äthylhydroxyäthyl-cellulose

durch mehrfache Craig-Verteilung von Ribonucleinsäure aus Ratten- und Kükenleber sowie aus Hefe Ribonucleinsäuren mit hohem Guanin- und hohem Adeningehalt partiell trennen und anreichern.

Mit einem neuen und interessanten Typ von Lösungsmittelsystemen, der die Verwendung von organischen Lösungsmitteln vollständig zu umgehen gestattet, befaßt sich ALBERTSSON[1,2] in Schweden. Es ist bekannt, daß Gemische von gewissen Polymeren bereits in sehr hoch verdünnten,

wäßrigen Lösungen zur Ausbildung von zwei Phasen Anlaß geben. Einige solche Polymerenpaare sind in Tab. 4 zusammengestellt. Es konnte gezeigt werden, daß eine ganze Reihe von teilweise sehr hochmolekularen Proteinen im System Dextran-Methylcellulose-Phosphatpuffer zur Verteilung günstige Verteilungskoeffizienten aufweisen (Tab. 5).

Tabelle 5. *Verteilungskoeffizienten einiger Proteine im System Dextran-Methylcellulose-Phosphatpuffer (1,58: 0,54: 97,88 Gew.%)*
Proteinkonzentration im Gesamtsystem 0,1—0,2 Gew.-%[2]

Protein	Molekulargewicht · 10^3	Verteilungskoeffizient	pH	Molare konz. Phosphatpuffer	Art der Proteinbestimmung
Ribonuclease	13	0,96	6,8	0,01	*N*
Cytochrom c	16	0,95	6,0	0,01	E_{410}
Pepsin	36	1,4	4,6	0,01	*N*
Ovalbumin	44	0,82	6,0	0,01	*N*
Hämoglobin (Mensch)	67	0,79	6,0	0,01	E_{420}
Enolase	68	0,76	6,0	0,01	*Enz.*
Serumalbumin (Mensch)	69	0,81	6,0	0,01	*N*
Gammaglobulin (Mensch)	156	0,6	6,0	0,1	*N*
Fumarase	204	0,65	7,0	0,01	*Enz.*
Katalase	250	0,75	6,0	0,01	E_{406}
Fibrinogen (Mensch)	340	0,3	6,0	0,1	*N*
Hämocyanin (Helix pomatia)	9000	$< 0{,}1$	6,0	0,01	*N*

Die enzymatische Aktivität der Proteine bleibt bei der Verteilung erhalten, wie das Beispiel der Enolase und der Fumarase zeigt. Wenn es gelingt, die gelösten Proteine, etwa durch Gelfiltration, von den Polymeren zu trennen, so dürften hier aussichtsreiche Systeme zur multiplikativen Verteilung vorliegen. Darüber hinaus ist gezeigt worden[1], daß sich die Verteilung in solchen Systemen auch auf Partikel von lichtmikroskopischen Dimensionen, z. B. auf Zellmembranen, Zellkerne, Mitochondrien und Mikrosomen, ausdehnen läßt. Die Verteilung dieser Partikel hängt im wesentlichen von den chemischen Eigenschaften ihrer Oberfläche ab.

Die Craig-Verteilung erlaubt grundsätzlich nicht den Durchsatz großer Substanzmengen in kontinuierlichem Betrieb. Dazu ist die ebenfalls nach ihrem Autor benannte O'Keeffe-Verteilung besser geeignet, bei der die Vervielfachung des Einzeleffektes auf andere Weise erzielt wird. Beide Verfahren sind einander in Abb. 8 gegenübergestellt. Man erkennt daraus, daß bei der O'Keeffe-Verteilung beide Phasen unter ständigem Stoffaustausch im *Gegenstrom* bewegt werden. Das Substanzgemisch wird in der Mitte der Apparatur zugeführt und in zwei Komponenten zerlegt, wovon die eine die Apparatur mit der Unterphase, die andere mit der Oberphase verläßt. Die Bewegungsabläufe von einer

Substanzzufuhr zur nächsten werden als ein Verteilungscyclus N zusammengefaßt. Mit einer solchen Verteilung können Gemische

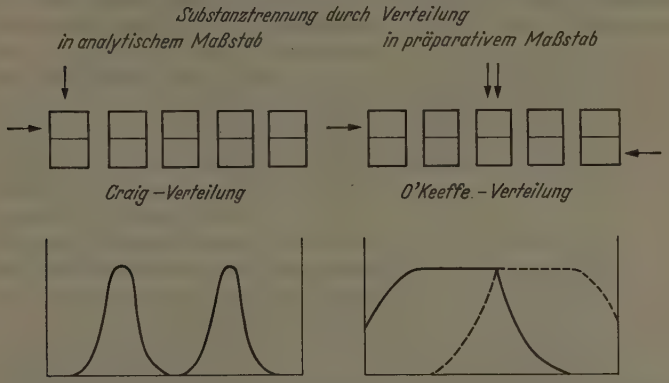


Abb. 8. Die beiden wichtigsten Verfahren der multiplikativen Verteilung und ihr Anwendungsbereich. Waagrechte Pfeile bedeuten die Bewegungsrichtung der Phasen, senkrechte Pfeile Ort und Art der Gemischzufuhr (einmalig, wiederholt) an[18a,b]

kontinuierlich getrennt werden. Hier handelt es sich im Gegensatz zur Craig-Verteilung um ein echtes Gegenstromverfahren.

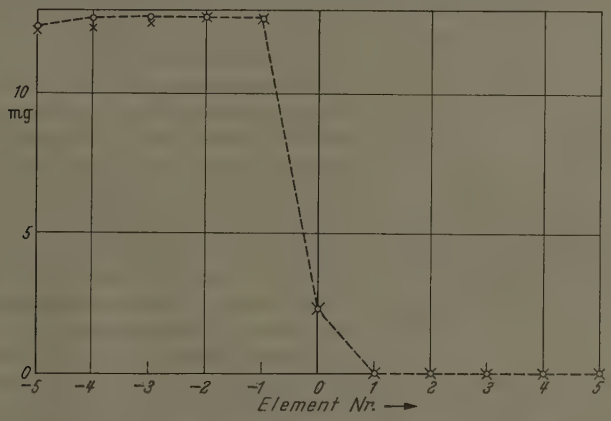


Abb. 9. O'Keeffe-Verteilung von Nicotinamid, Erläuterung im Text

Wir haben daher bereits vor Jahren[22] in Übereinstimmung mit zahlreichen Fachkollegen vorgeschlagen, den irreführenden Terminus Gegenstromverteilung für das von Craig ins Laboratorium eingeführte Verfahren nicht mehr zu gebrauchen und statt dessen den Terminus Craig-Verteilung zu verwenden.

Eine vollständige Berechnung des Verfahrens ist uns vor drei Jahren erstmalig gelungen[20]. Anschaulicher als Formeln — auf deren Wiedergabe hier verzichtet werden soll — sind die damit berechneten Verteilungskurven. Die gute Übereinstimmung zwischen berechneten und experimentell gefundenen Werten zeigt Abb. 9. Es wurde Nicotinamid mit einer Verteilungszahl von $G = 0{,}1$ im System Essigester-Wasser ($V = 1{,}0$) einer O'Keeffe-Verteilung in $z = 11$ Elementen unterworfen[20] und die Verteilung bei $N = 8$ Verteilungscyclen gestoppt, da der stationäre Zustand dann schon erreicht ist. Die gefundenen Werte sind durch Kreuze, die berechneten durch Kreise wiedergegeben.

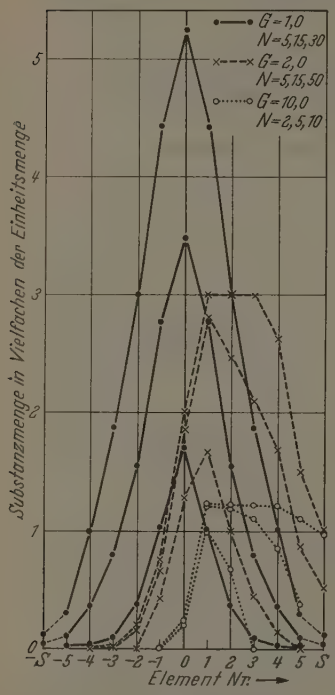


Abb. 10. Einstellung des stationären Zustandes bei der O'Keeffe-Verteilung in Abhängigkeit von der Verteilungszahl G[20]. Die Elemente der Batterie sind mit Ziffern, die entnommenen Fraktionen mit $\pm S$ bezeichnet. In Element O wird zu Beginn eines jeden Verteilungscyclus N die Substanzmenge 1 zugeführt

Der berechnete Verlauf der Verteilung von Substanzen mit verschiedenen Verteilungskoeffizienten in einer Batterie mit $z = 11$ Elementen ist in Abb. 10 dargestellt. Man erkennt, daß z. B. bei $G = 10$ die Substanzmenge in Wanderungsrichtung der Oberphasen (steigende positive Nummern der Elemente) mit zunehmender Zahl von Verteilungscyclen ($N = 2$ und $N = 5$) zunimmt, bis sie bei $N = 10$ Verteilungscyclen in fast allen Elementen einen konstanten Wert erreicht hat, der beim 1,2fachen der in Element 0 bei jedem Cyclus zugeführten Substanzmenge liegt ($N = 10$). Diese Menge ändert sich bei weiterem Fortschreiten der Verteilung nicht mehr. Es verläßt daher die Batterie bei jedem Verteilungscyclus ebensoviel Substanz in Fraktion S wie ihr in der Mitte zugeführt wird: Die Verteilung befindet sich im stationären Zustand. Dieser wird um so langsamer erreicht, je näher die Verteilungszahl beim Wert $G = 1$ liegt (vgl. $G = 2{,}0$). Bei $G = 1$ verläßt die eine Hälfte der Substanz die Batterie in der Oberphase, die andere Hälfte in der Unterphase, wie aus den Verteilungskurven für $G = 1$ hervorgeht.

Analog diesem Beispiel läßt sich für jedes kontinuierliche Verteilungsverfahren die Substanzmenge in den Elementen einer Verteilungsapparatur mit z Elementen für beliebige Verteilungszahlen G und nach Ablauf

von beliebig vielen Verteilungscyclen N nach unserem Ansatz angeben. Damit gehen seine Aussagemöglichkeiten wesentlich über die bisher üblichen Berechnungsverfahren hinaus. Diese beruhen auf Stoffbilanzüberlegungen und führen zu Ausdrücken, die nur die Substanzmengen zu berechnen gestatten, die die Apparatur an beiden Enden verlassen, entsprechend den Fraktionen S und $-S$ in Abb. 10. Sie gelten außerdem lediglich für den stationären Zustand, der als Voraussetzung in den Ansatz eingeht. Über die Anlaufzeit des Verfahrens sowie über die Substanzmenge in den Elementen und deren Summe, den Betriebsinhalt der Batterie, kann mit Stoffbilanzüberlegungen keine Aussage gemacht werden.

Da die Berechnung solcher Verteilungskurven sehr mühsam ist, wurde das Problem mit Hilfe der Methoden der linearen Algebra in eine solche Form gebracht, daß die Rechnung auf dem elektronischen Rechenautomaten IBM 650 durchgeführt werden kann[7]. Der Ablauf kontinuierlicher Verteilungsverfahren mit Substanzzufuhr in der Mitte (O'Keeffe-Verteilung) und am Anfang der Batterie (Watanabe-Morikawa-Verteilung) sowie an beliebigen Stellen dazwischen kann nunmehr in kürzester Zeit für alle interessierenden Parameter vorausberechnet werden.

Welche Vorteile bietet nun die O'Keeffe-Verteilung und ist sie außer für präparative Trennungen auch für analytische Fragestellungen von Interesse? Hier wie bei der Craig-Verteilung wird man in erster Linie nach dem Aufwand zur Trennung von Substanzen in Abhängigkeit vom Trennfaktor β fragen. Die Antwort gibt die Trennfunktion des Verfahrens, die wir auf Grund unseres Ansatzes ableiten konnten.

In Tab. 6 ist die Zahl n der Verteilungsschritte bzw. die Zahl z der Verteilungselemente zusammengestellt, die aufgewendet werden müssen, um zwei Substanzen mit dem Trennfaktor β durch Craig-Verteilung bzw. durch O'Keeffe-Verteilung bis zu 99%iger Reinheit zu trennen. Für $\beta = 9$ sind beispielsweise bei Craig-Verteilung $n = 21$ Verteilungsschritte, bei O'Keeffe-Verteilung aber nur $z = 4$ Verteilungselemente erforderlich. Dieser Unterschied fällt noch stärker ins Gewicht bei sehr kleinen Trennfaktoren, wie man beim Vergleich der Werte für $\beta = 1{,}5$ oder $\beta = 1{,}1$ erkennt. Neben der Möglichkeit des kontinuierlichen Betriebs bietet die O'Keeffe-Verteilung bei Zweistofftrennungen auch den Vorteil eines wesentlich geringeren apparativen Aufwands. Dies ist bereits zur Trennung der Lanatoside A bis D[35] und zur Trennung stereoisomerer Methylcyclohexanole[30] ausgenützt worden. Auch die beiden Peptidketten des hochmolekularen Proteins Globin lassen sich durch O'Keeffe-Verteilung in wenigen Elementen trennen[8].

Naturgemäß kann der apparative Aufwand auch bei der O'Keeffe-Verteilung durch eine geschickte Lösungsmittelauswahl noch weiter

reduziert werden. Ein schönes Beispiel dafür gaben vor kurzem JANTZEN u. ANDREAS[26].

Bekanntlich sind Gemische aus gesättigten und ungesättigten Fettsäuren bzw. deren Estern dann besonders schwer zu trennen, wenn sie

Tabelle 6. *Aufwand zur Trennung zweier Substanzen mit gegebenem Trennfaktor β bei Craig- und O'Keeffe-Verteilung. Geforderte Reinheit der beiden Substanzen 99%*[17]
Weitere Erläuterungen im Text

β	Craig-Verteilung $n = \frac{C_E}{\frac{\beta+1}{\sqrt{\beta}} - 2}$	O'Keeffe-Verteilung $z = \frac{C_E'}{\log \beta}$
9,0	21	4
8,0	24	4
7,0	28	5
6,0	33	5
5,0	42	6
4,0	57	7
3,0	92	8
2,0	230	13
1,5	689	23
1,1	13 700	97

aus Fettsäuren gleicher Kohlenstoffzahl bestehen (Tab. 7). So zeigen z. B. Stearinsäure- und Ölsäuremethylester im System Isooctan-95% Methanol einen Trennfaktor von $\beta = 1{,}6$, und zu ihrer Trennung sind $n = 512$ Verteilungsschritte der Craig-Verteilung bzw. $z = 20$ Elemente

Tabelle 7. *Verteilung von Stearin- und Ölsäuremethylester im System Isooctan-95% CH_3OH mit und ohne Zusatz von $HgAc_2$*[26]
Erläuterungen im Text

Substanz	K	β	$n_{99\%}$	$z_{99\%}$
Stearinsäuremethylester	17,6	1,6	512	20
Ölsäuremethylester	10,8			
Stearinsäuremethylester	17,6	63	5	2
Ölsäuremethylester-$HgAc_2$ Add.	0,28			

bei der O'Keeffe-Verteilung erforderlich. In Gegenwart von Quecksilber(II)-chlorid wird der Verteilungskoeffizient des Ölsäuremethylesters wesentlich erniedrigt, während der der Stearinsäure unverändert bleibt. Der Trennfaktor der beiden Ester steigt also durch den Zusatz von $HgAc_2$ auf $\beta = 63$, und man kann mit Hilfe der Trennfunktion leicht

ausrechnen, daß schon zwei Verteilungselemente zur praktisch quantitativen Trennung der beiden Ester durch O'Keeffe-Verteilung ausreichen müssen.

Das Ergebnis einer O'Keeffe-Verteilung in drei Scheidetrichtern bei Ausführung von $N = 15$ Verteilungscyclen ist in Tab. 8 wiedergegeben.

Tabelle 8. *Trennung Stearinsäure-Ölsäuremethylester*[26]
O'Keeffe-Verteilung ($z = 3$, $N = 15$); System Isooctan-95%ig. wäßr. CH_3OH + 0,3% Essigsäure, $V = 1$

Substanzen	eingesetzt g	Ausbeute g	F_P °C	Reinheit (Jodzahl)	Phasen
Stearinsäuremethylester	0,5371	0,5280	37,8	99,2%	Isooctan
Ölsäuremethylester	0,2965	0,2821	— 19,9	97,5%	Methanol
Hg^{II}-acetat	0,621	—	—	—	—

Es wurden die im Gemisch eingesetzten Ester praktisch quantitativ und in einer Reinheit wiedergewonnen, die von der vorausberechneten nicht signifikant abweicht.

Durch die neuen Erkenntnisse von der Leistungsfähigkeit der O'Keeffe-Verteilung wurde auch der Apparatebau stimuliert. Bereits vor mehreren Jahren haben wir eine Technik zur Ausführung der O'Keeffe-Verteilung in den üblichen Verteilungsbatterien* angegeben[21]. Vor kurzem hat nun v. Metzsch[34] eine Verteilungsbatterie beschrieben, die die O'Keeffe-Verteilung und andere kontinuierliche Verfahren vollautomatisch auszuführen gestattet**. Das dabei verwendete Verteilungselement ist im Prinzip zuerst von Alderweirelt u. Verzele[3] angegeben worden. Mit der neuen Apparatur ist die Anwendung des Verfahrens sehr einfach, und seine Vorteile lassen erwarten, daß es eine rasche Verbreitung findet.

Craig- und O'Keeffe-Verteilung ergänzen sich gut und geben die Möglichkeit, Gemische durch multiplikative Verteilung sowohl im Mikromaßstab als auch in technischem Umfang zu trennen. Verbesserte und wesentlich erweiterte Anwendungsmöglichkeiten sollten aber hier ebensowenig wie bei anderen Trennverfahren zur Einseitigkeit in der Anwendung führen. Schwierige Trennprobleme können oft nur gelöst werden, wenn man mehrere Trennverfahren wirkungsvoll zu kombinieren versteht. Voraussetzung dazu ist sowohl die Kenntnis der physikalisch-chemischen Vorgänge, auf denen die jeweiligen Einzeleffekte beruhen, als auch die Kenntnis der Möglichkeiten, die in den verschiedenen Ausführungsformen des Multiplikationsprinzips liegen.

* Hersteller: Wissenschaftliche Apparate F. Bühler, Tübingen, Reutlingerstr. 6.
** Hersteller: Glasapparatebau Göttingen, H. Rettberg, Göttingen, Hospitalstraße 4c.

Zusammenfassung

Multiplikative Verteilungsverfahren haben sich als Routinemethoden zur Trennung von Substanzen aller Stoffklassen durchgesetzt. Neue analytische Anwendungen ergaben sich in der radioaktiven Verdünnungsanalyse. Darüber hinaus ist die Anwendung der Verfahren in den letzten Jahren besonders auf hochmolekulare Verbindungen von technologischem und biologischem Interesse ausgedehnt worden. Entscheidende Bedeutung kommt dabei der Auswahl geeigneter Lösungsmittelsysteme zu. Eine Anzahl geeigneter Phasenpaare wird diskutiert. Der Mechanismus kontinuierlicher Verfahren ist eingehend untersucht worden und hat zu mathematischen Ansätzen geführt, die eine Berechnung sämtlicher interessierenden Parameter auf elektronischen Rechenautomaten (IBM 650) ermöglichen. Die Bedeutung der kontinuierlichen Verfahren auch für analytische Probleme wird aufgezeigt.

Literatur

[1] Albertsson, P. A.: Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) **27**, 378 (1958). — [2] Albertsson, P. A.: Nature (London) **182**, 709 (1958). — [3] Alderweireldt, F. u. M. Verzele: Nature (London) **174**, 702 (1954). — [4] Almin, K. E., u. B. Steenberg: Acta chem. scand. **11**, 1541 (1957); **13**, 1263, 1274, 1278, 1287, 1293 (1959). — [5] Baggett, B., u. L. L. Engel: J. biol. Chemistry **229**, 443 (1957). — [6] Bell, P. H.: J. Amer. chem. Soc. **76**, 5565 (1954). — [7] Börsch-Supan, W.: Z. Naturforsch. **14b**, 56 (1959). — [8] Braunitzer, G. u. Mitarb., MPI f. Biochemie (unveröff. Versuche). — [9] Craenhals, E., u. J. Leonis: Bull. Soc. chim. Belges **64**, 58 (1955). — [10] Craig, L. C.: J. biol. Chemistry **155**, 519 (1944). — Rauen, H. M., u. W. Stamm: Gegenstromverteilung, Springer-Verlag, Berlin - Göttingen - Heidelberg 1953. — [11] Craig, L. C., W. Hausmann, E. H. Ahrents jr. u. E. J. Harfenist: Analyt. Chemistry **23**, 1326 (1951); vgl. diese Z. **136**, 443 (1952). — [12] Geschwind, I. I., u. C. H. Li: J. Amer. chem. Soc. **79**, 615 (1957). — [13] Geschwind, I. I., C. H. Li u. L. Barnaf: J. Amer. chem. Soc. **79**, 1003 (1957). — [14] Hamann, K., W. Funke u. H. Gilch: Angew. Chem. **71**, 596 (1959). — [15] Harfenist, E. J., u. L. C. Craig: J. Amer. chem. Soc. **74**, 3083 (1952). — [16] Hausmann, W., u. L. C. Craig: J. Amer. chem. Soc. **80**, 2703 (1958). — [17] Hecker, E.: Mitteilungsbl. d. Chem. Ges. DDR Sonderheft **1960**, 21. — [18] Hecker, E.: [a] Verteilungsverfahren im Laboratorium, Monographie Nr. 67 d. Angew. Chem. und Chem.-Ing.-Techn. Verlag Chemie, Weinheim Bergstr. 1955. — [b] Multiplikative Verteilung, in Handbuch der Pflanzenanalyse, Bd. 1, S. 66. Berlin - Göttingen - Heidelberg: Springer-Verlag 1956. — [19] Hecker, E.: Z. Naturforsch. **8b**, 77 (1953). — [20] Hecker, E.: Z. Naturforsch. **12b**, 519 (1957). — [21] Hecker, E.: Chem.-Ing.-Techn. **29**, 23 (1957). — [22] Hecker, E., u. K. Allemann: Angew. Chem. **66**, 557 (1954). — [23] Hill, R. J., u. L. C. Craig: J. Amer. chem. Soc. **81**, 2272 (1959). — [24] Höss, H. G.: Diss. München 1959. — [25] Holley, R. W., B. P. Doctor, S. H. Merrill u. F. M. Saad: Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) **35**, 272 (1959). — [26] Jantzen, E., u. H. Andreas: Chem. Ber. **92**, 1427 (1959). — [27] Kenner, G. W.: Symposium on Peptide Chemistry, London 1955. — [28] King, T. P., u. L. C. Craig: J. Amer. chem. Soc. **80**, 3366 (1958). — [29] Kirby, K. S.: Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) **41**, 338 (1960). — [30] Kortüm, G., u. A. Bittel: Chem.-Ing.-Techn. **30**, 95 (1958). — [31a] Li, C. H.: Adrances in Protein Chemistry **XII**, 269 (1957). — [31b] Loc. cit. **XI**, 101 (1956). — [32] Li, C. H., I. I. Geschwind, A. L. Levy, J. I. Harris, J. S. Dixon, N. G. Pon u. J. O. Porath: Nature (London) **173**, 251 (1954). — Li, C. H.,

I. I. GESCHWIND, J. S. DIXON, A. L. LEVY u. J. I. HARRIS: J. biol. Chemistry **213**, 171 (1955). — [33] METZSCH, F. A. VON: Chem.-Ing.-Techn. **25**, 66 (1953). — [34] METZSCH, F. A. VON: Chem.-Ing.-Techn. **31**, 262 (1959). — [35] SCHMIDT, H. J., u. F. DITTRICH: Mitteilungsbl. Chem. Ges. DDR Sonderheft 1960, 333. — [36] SCHÖNENBERGER, H.: Chem. Ber. **91**, 862 (1958). — [37a] DU VIGNEAUD, V., u. Mitarb.: J. Amer. chem. Soc. **74**, 3713 (1952). — [37b] DU VIGNEAUD, V.: Harvey Lectures 1954/1955. Academic Press, New York 1956, S. 1. — [38] WHITE, W. F.: J. Amer. chem. Soc. **75**, 503 (1953).

Dr. ERICH HECKER,
Max Planck-Institut für Biochemie, München 15, Goethestraße 31, Postschließfach 64

Aus dem Botanischen Institut der Universität des Saarlandes, Saarbrücken

Dünnschicht-Chromatographie*

(Thin-layer-Chromatography, Chromatographie sur couches minces)

Von
EGON STAHL

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 2. September 1960)

Den großen Fortschritt bei der Verteilungschromatographie brachte der Übergang von der „geschlossenen" zur „offenen" Säule — zur Papierchromatographie. Ein gleichartiger Schritt führte auf dem Gebiet der Adsorptionschromatographie von der Tswettschen Säule zur dünnen, auf einer Trägerscheibe fest haftenden Sorptionsschicht. Dieser Weg wurde bereits 1938 von ISMAILOW u. SCHRAIBER[9] begangen**.

Auf 2 mm dünnen Aluminiumoxidschichten trennten sie zahlreiche u. a. alkaloidhaltige Arzneipflanzenauszüge. Die Methode geriet, wenn man von der von KIRCHNER u. Mitarb.[11] induzierten gelegentlichen Anwendung auf dem Gebiet der ätherischen Öle absieht, wieder in Vergessenheit.

Erst 20 Jahre später, nachdem die verfahrenstechnischen Schwierigkeiten gelöst, die Bedingungen standardisiert und die Anwendungsbreite

---

* Herrn Prof. Dr. KURT MOTHES in Verehrung zum 60. Geburtstag gewidmet; Übersichtsreferat und zugleich Vorbericht zur VI., VII. und VIII. Mitteilung.

** In der englischen Zusammenfassung der russisch geschriebenen Arbeit wird die Methode bereits treffend mit folgenden Worten beschrieben: „A method for chromatographic adsorption analysis is elaborated based on the observation of the division of substances into zones on a *thin layer of adsorbent*, using one drop of the substance. The results obtained by the method proposed are qualitatively the same as those obtained by the usual chromatographic adsorption method of analysis. The method enables to obtain satisfactory results using one drop of the substance under test, very small quantities of the adsorbent and minimal time. The method may be used for the evaluation of galenical preparations and their identification as well as for a preliminary test of the adsorbent and the kind of the developer."

gezeigt wurde, gewann die Methode unter der Bezeichnung Dünnschicht-Chromatographie* schnell an Bedeutung[23–29]. Die Gründe für die günstige Aufnahme dieses Verfahrens sind wohl folgende: Die Trennzeit ist kurz, sie liegt je nach dem Elutionsmittel zwischen 20 und 100 min. Im Gegensatz zu den Tswettschen Säulen ist die Trennschärfe wesentlich besser, und man hat die Möglichkeit mit den aggressivsten Sprühreagentien den Trennerfolg sofort festzustellen. Auf den fluorescenzfreien, rein anorganischen Sorptionsschichten liegt einerseits die untere Erfassungsgrenze erheblich unter der Papierchromatographie und andererseits lassen sich oft noch Milligramm-Mengen trennen.

Der Einsatzschwerpunkt lag im Gegensatz zur normalen Papierchromatographie zunächst im Bereich der lipophilen Stoffgemische. Der Anwendungsbereich läßt sich jedoch bei Verwendung polarer Elutionsgemische bis in den stark hydrophilen Stoffbereich ausdehnen.

Herstellen dünner Sorptionsschichten

Die rationelle Herstellung gleichmäßig dünner, festhaftender, rein anorganischer Sorptionsschichten ist nach folgendem Verfahren[24] am besten möglich:

Auf einer Schablone werden Glasscheiben (20 × 20 cm) oder Streifen (5 bis 10 × 20 cm) genau gleicher Stärke zu einer Bahn ausgelegt und mittels des Dünnschicht-Streichers die dünnflüssige Sorptionsmasse in einem Zug aufgetragen (Abb. 1). Zum Trocknen werden die beschichteten Scheiben in einem ebenfalls hierzu geschaffenen Trockengestell gestapelt und in senkrechter Lage etwa 30 min auf 100°—140° C erhitzt. Danach sind sie gebrauchsfertig und können im gleichen Gestell in einem Exsiccator über Blaugel aufbewahrt werden. Die zu einer „Grundausrüstung" zusammengefaßten Standardgeräte werden von der Firma DESAGA, *Heidelberg, Hauptstraße 60*, hergestellt.

Die zur Herstellung dünner Trennschichten verwendeten Sorptionsmittel müssen in ihrer Korngrößenzusammensetzung, Oberflächenstruktur und Haftfestigkeit der Methode angepaßt sein. Diesen Erfordernissen entsprechen meist nur die speziell hierfür hergestellten und standardisierten Sorptionsmittel, wie z. B.:

1. Kieselgel G „Merck" zur Dünnschicht-Chromatographie[16]. Die Kieselgel G-Schichten haben eine Brockmannsche Aktivitätsstufe, die nahe bei II liegt. Auf diesen Schichten lassen sich die meisten adsorptionschromatographischen und auch die bisher auf formamidimprägnierten Papieren durchgeführten verteilungschromatographischen Trennprobleme lösen.

2. Aluminiumoxid G „Merck" zur Dünnschicht-Chromatographie[16]. Die schwach alkalischen Aluminiumoxid G-Schichten eignen sich vor allem zur Auftrennung basischer Stoffgemische (Alkaloide, Amine usw.). Außerdem lassen sich alle bisher für Aluminiumoxidsäulen beschriebene Trennungen hierauf durchführen.

* Der Name kennzeichnet die Methode am besten und wird daher allgemein den weniger treffenden Wortprägungen wie *Chromatostrip* (KIRCHNER, MILLER u. KELLER)[11], *Chromatoplate* (REITSEMA)[20] oder neuerdings *„analytische Chromatographie"* (TEICHERT, MUTSCHLER u. ROCHELMEYER)[34] vorgezogen.

3. Kieselgur G „Merck" zur Dünnschicht-Chromatographie[16]. Auf Kieselgur G-Schichten lassen sich verteilungschromatographische Trennungen stark hydrophiler (z.B. Zucker) und amphoterer Substanzgemische erreichen.

Verwendet man zur Herstellung der Streichmasse statt Wasser verdünnte Säuren (z.B. 0,5 n Oxalsäure), Laugen, Puffer usw., so erhält man sogenannte Reaktionsschichten, auf denen sich spezielle Trennprobleme lösen lassen[26]. Neben den beschriebenen Sorptionsmitteln (1—3) kann man Schichten aus Calcium- und/oder Magnesiumphosphaten, -oxiden oder -silicaten, Cellulosepulver[34], Stärke, Zucker und Perlon-(Polyamid-)pulver, Harnstoff usw. herstellen. Interessante Trennmöglichkeiten dürften die von Beckett u. Anderson[2] beschriebenen „optisch aktiven Kieselgele" erschließen.

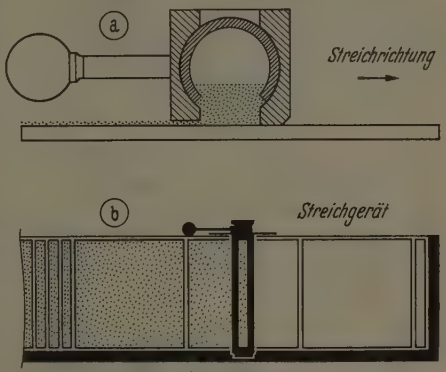


Abb. 1. a Arbeitsweise des Dünnschicht-Streichgerätes; b Arbeitsschablone mit aufgelegten Glasscheiben (Punktierung = Sorptionsmasse)

Auftragen der Substanzen und Auswahl des Elutionsmittels

Das Auftragen der zu trennenden Gemische (1 bis 10 mm³) erfolgt wie bei der Papierchromatographie[6]. Die Platte wird danach in eine dichtschließende, etwa 0,5 cm hoch mit dem Elutionsmittel beschickte Trennkammer gestellt. Beim Aufsteigen des Lösungsmittels trennen sich die Gemische. Zumeist genügt eine Trennstrecke von 10 cm. — Bei der Auswahl des Elutionsmittels kann man sich der Mikrozirkulartechnik[24] bedienen und sich nach der Eigenadsorption der Lösungsmittel (Eluotrope Reihe) bzw. nach der mixotropen Lösungsmittelreihe von E. Hecker[7] richten.

Sichtbarmachung und untere Erfassungsgrenze

Auf den rein anorganischen fluorescenzfreien Schichten (1—3) lassen sich im Gegensatz zur Celluloseschicht die meisten farblosen und nicht fluorescierenden Substanzen durch das Aufsprühen aggressiver Reagentien, z.B. konzentrierte Säuren mit oder ohne Zusatz eines Aldehyds Antimonchloridlösungen usw. und durch zusätzliches starkes Erhitzen sichtbar machen. Außerdem ergeben die in der Papierchromatographie erprobten Sprühreaktionen[6,16] nur in Ausnahmefällen auf anorganischen Schichten schlechtere Ergebnisse. Wir fanden, daß dann zumeist die

Cellulose (bzw. deren Abbauprodukte) an der Farbreaktion mitbeteiligt ist[29]. In diesen Fällen setzten wir dem Sprühreagens Cellulosehydrolysat bzw. Zucker zu.

Nach den bisherigen Erfahrungen liegt in der Regel die untere Erfassungsgrenze der getrennten Substanzen um 1—2 Zehnerpotenzen tiefer als bei der Papierchromatographie. Die entsprechenden Vergleichsversuche zeigten, daß auf den Kieselgel G- und Aluminiumoxid G-Schichten nach der Trennung die Konzentration der Substanzen je „Flächeneinheit" (richtiger Volumeneinheit) wesentlich höher ist als auf den Cellulose- oder Glasfaserpapieren. Das Beispiel der Ausbreitung steigender Mengen eines Indolalkaloids auf formamidimprägniertem Papier (Abb. 2, Kurve I) und auf einer Kieselgel G-Schicht (Abb. 2, Kurve II) zeigt diesen Unterschied. Aus dem Kurvenverlauf ergibt sich außerdem, daß quantitative Aussagen nach der Größe der Zonenfläche („Fleckengröße") bei der Dünnschicht-Chromatographie nicht befriedigen können.

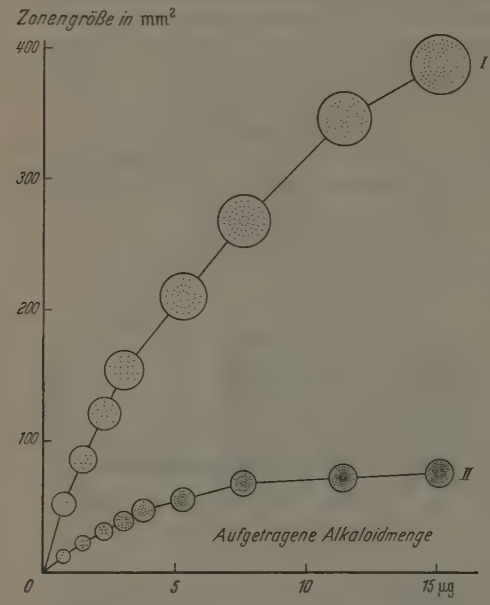


Abb. 2. Vergleich der „Fleckengröße" steigender Alkaloidmengen bei gleicher Laufstrecke (10 cm). Kurve *I* auf formamidimprägniertem Papier[4], Kurve *II* auf einer Kieselgel G-Schicht. Die zusätzliche Punktierung der Zonen soll die Zahl der Moleküle je Fleck (Zone) symbolisieren

Techniken

a) Außer der zumeist angewendeten aufsteigenden Trennung lassen sich auf den Schichten auch die *Zirkular-* und die *Formgebungs-*(= Keilstreifen) Technik[25] einschließlich des Chromatofug-Verfahrens durchführen.

b) Um den bei Elutionsgemischen auftretenden Randeffekt auszuschalten, arbeitet man mit „*Kammerübersättigung*"[26]. Hierzu wird ein mit dem verwendeten Elutionsgemisch getränkter Filtrierpapierstreifen an den Breitseiten der Trennkammer-Innenwand adhäsiv befestigt. Die

Laufzeit der Chromatogramme verkürzt sich hierdurch um etwa ein Drittel. der Randeffekt tritt nicht mehr auf und man kann gut reproduzierbare R_f-Werte erhalten.

c) Die *Stufentechnik* wird angewandt. wenn sich in einem Lösungsmittel nur der eine Teil des Gemisches auftrennen läßt und in einem anderen nur der andere. Um die Vorteile beider Lösungsmittel zu vereinigen. chromatographiert man damit nacheinander mit verschieden langer Trennstrecke. z. B. Carotinoid-Gemische mit Chloroform 5 cm und danach mit Hexan 10 cm hoch[26].

d) Eine zweidimensionale Technik (Trennung-Reaktion-Trennung = TRT) mit einer Zwischenreaktion läßt sich zur schnellen Erkennung chemischer Veränderungen der einzelnen Substanzen eines Stoffgemisches nach Einwirkung von Strahlen (γ-. Röntgen-. UV-Strahlen). Gasen und Temperaturen einsetzen. Die TRT-Technik wurde z.B. zum Studium der Inaktivierung der Pyrethrine von Stahl[27] verwendet.

Anwendungsbereich

Nach den im lipophilen Stoffbereich gesammelten Erfahrungen[23-33] darf gesagt werden. daß alle bisher auf Aluminiumoxid-[41] und aktivierten Kieselgelsäulen durchgeführten Trennungen mit wesentlich verbesserter Trennschärfe im Mikromaßstab auf den dünnen Kieselgel G- und oder Aluminiumoxid G-Schichten gelingen. Die nachstehende Tabelle gibt einen Überblick der bisher (1958 bis Mitte 1960) mit der Dünnschicht-Chromatographie getrennten Stoffgruppen.

Außer den bereits früher beschriebenen Anwendungsmöglichkeiten hat sich die Methode zur Kontrolle der auf dem Wege der Gasphasenchromatographie ätherischer Öle erhaltenen Fraktion bewährt. Hierdurch konnten bei uns schon manche Zweifel und Fehlschlüsse. die durch Überlagerung. Wasserabspaltung und Zersetzung eintraten, schnell geklärt werden (Stahl u. Trennheuser[33]).

Es schien uns nun an der Zeit. auch die Anwendungsbreite im hydrophilen Stoffbereich besser kennenzulernen[23]. Allerdings wollten wir nicht auf die Vorteile rein anorganischer Schichten verzichten und auch Lösungsmittelgemische ermitteln. die Laufzeiten unter 60 min (für 10 cm Trennstrecke) ergeben.

Neue Einsatzmöglichkeiten

Schöne Erfolge ergaben sich auf dem Gebiet der Spurenanalyse von pflanzlichen Wuchsstoffen und verwandten Indolderivaten. Einmal ließen sich die in Betracht kommenden Verbindungen trennen und zum anderen noch bis zu 0,005 μg sichtbar machen (Stahl u. Kaldewey[30]). Als erstes Beispiel sei die Trennung eines Gemisches: Tryptophan (R_f 0,0), Indol-3-acetamid (R_f 0.2). Indol-3-essigsäure (R_f 0.34), Indol-

Tabelle. *Anwendungsgebiete der Dünnschicht-Chromatographie in den Jahren 1958 bis Mitte 1960*

Stoffgruppe	Trennschicht	Elutionsmittel	Technik*	Literatur
Äther. Öle	Kieselgel G	Benzol und isoeluotrope Gemische	A, NS	3,5,23,24,25,28,
		Benzol + Chloroform 1 + 1	A, KÜS	33,37,38,40,49
Alkaloide	Kieselgel G	Chloroform + 5—15% Methanol	A, KÜS	12,13,16,18,19,
	Kieselgel G „Alkal."			21,23,29,34,48 59
	Aluminiumoxid G	Cyclohexan + Chloroform (3 + 7) u. U. + 0,5% Diäthylamin		
Amine	Kieselgel G	Äthanol + 25%ige Ammoniaklösung (4:1) u. a.		34
	Kieselgel G gepuffert			
	Cellulose			
Aminosäuren	Kieselgel G gepuffert	1. 50% n-Propanol, 2. Phenol + Wasser (10:4)	A, 2D	17,18,19,42,60
	Kieselgel G gepuffert	1. 70% Äthanol, 2. Äthanol + NH_3-Lsg. 25% (4:1)	A, 2D	
	Aluminiumoxid (lose aufgestreut)	n-Butanol + 50% Äthanol u. a.	H	
Antioxydantien	Kieselgel G	1. Chloroform, 2. Benzol	A, 2D	22
Arzneimittel (Analyse, Toxikologie)	Kieselgel G gepuffert	Methanol u. a.	A	12,13,16,19,21
	Kieselgel G	Chloroform u. a.	A	28,34,45
	Kieselgel G	Methanol; Chloroform + 15% Äther	A	
Azulene, Proazulene	Kieselgel G	Hexan-Essigester (9 + 1) u. a.	A, NS	23
Carotine u. ä. Blattpigmente	Kieselgel G	1. Stufe Chloroform	A, St.	5,8,27,29,39
		2. Stufe Hexan		
Cholesterinester	Kieselgel G	Cyclohexan-Benzol (4:1 V/V) u. a.	A, NS	4,15,28,36,50,57
Fettfarbstoffe	Kieselgel G	Benzol, Chloroform u. ä.		24,25
Harze, Balsame, Wachse u. ä.	Kieselgel G	Benzol, Chloroform u. ä.	A, NS	24,25,28
Lipide, (pflanzliche und tierische Fette, Öle und Wachse)	Kieselgel G	Petroläther + 8% Äther und zahlreiche andere	A, NS	14,15,24,28,36, 46,47,52,53,54

Pyrethrinperoxide		Benzol, Chloroform	A, NS, KÜS	24,27
Phenole, Phenoläther	Kieselgel G Kieselgel G „sauer“	Benzol Cyclohexan + Chloroform +	A, NS, KÜS	16,24,25
o-, m-, p-Kresol	Kieselge G	Diäthylamin (5 + 5 + 1)	A, KÜS	
Pyrethrine und Synergisten	Kieselgel G	Chloroform isoeluotrope Gemische	A,TRT,KÜS	27
Steroide (Schwangerschafts-Frühnachweis)[35]	Kieselgel G Kieselgel G	Chloroform und isoeluotrope Gemische Cyclohexan:Essigester (70:30) Chloroform-Aceton (9 + 1)	A, KÜS A, NS A, KÜS	1,4,28,29,35
Teere (med. verwendete)	Kieselgel G	Benzol	A, NS	24,25,28
Tetrapyrrolderivate	Kieselsäure-Stärke	Benzol-Essigester-Äthanol (90:20:7,5 V/V)	A, NS	5
Vitamine, fettlösliche	Kieselgel u. a.	Hexan, Chloroform usw.	A, NS, KÜS	8,29
Glykoside u. Aglukone (Digitalis, Scilla, Strophanthus, Podophyllum u. a.)	Kieselgel G	Methylenchlorid + 20% Methanol + 1% Formamid; Chloroform + 10—20% Methanol u. a.	A, KÜS z. T. St	57
Phosphatide u. a. Gehirnlipoide	Kieselgel G	versch. Systeme u. a. Chloroform-Methanol-Wasser außerdem basische und saure	A, KÜS	50,51,58
Pteridinderivate	Kieselgel G Aluminiumoxid	neutrale, saure und bas. Gemische	A, NS?	55
Thiophosphorsäureester (E 605, Systox u. 7 weitere)	Kieselgel G	Methanol-Methylenchlorid Ammoniaklösung (10%ig) (20:80:3 und 35:65:5)	A, KÜS	43
Vitamine der B-Gruppe und Vitamin C	Kieselgel G + 2% Leuchtstoff ZS-Super	Eisessig/Aceton/Methanol/Benzol (5/5/20/70)	A, NS?	44
Weichmacher, 16 versch. (Plasticizer)	Kieselgel G	Iso-octan + 10% Äthylacetat Benzol + 5% Äthylacetat Dibuthyläther + 10% Hexan	A, NS?	56

* A = aufsteigende Chromatographie, NS = mit normaler Kammersättigung, KÜS = mit „Kammerübersättigung“, 2D = zweidimensionale Technik, St = Stufentechnik, TRT = Trennung-Reaktion-Trennung (zweidimensional), H = horizontale Arbeitsweise.

3-propionsäure (R_f 0,42), Indol-3-buttersäure (R_f 0,49), Indol-3-acetonitril (R_f 0,61), Skatol (R_f 0,85) mit dem Gemisch Chloroform + 5%

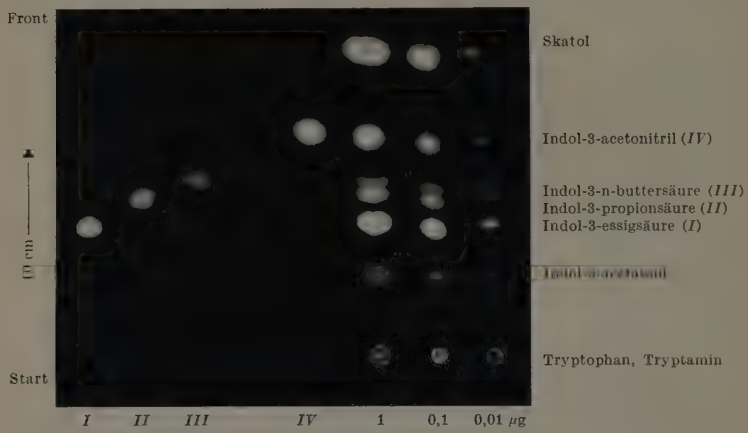


Abb. 3. Dünnschicht-Chromatogramm von Indolderivaten auf einer Kieselgel G-Schicht im ultravioletten Licht aufgenommen. Die Laufzeit für die 10 cm-Trennstrecke betrug 36 min. Die am Startpunkt verbleibenden Verbindungen (einschl. Serotonin) trennen sich in basischen Gemischen[20]

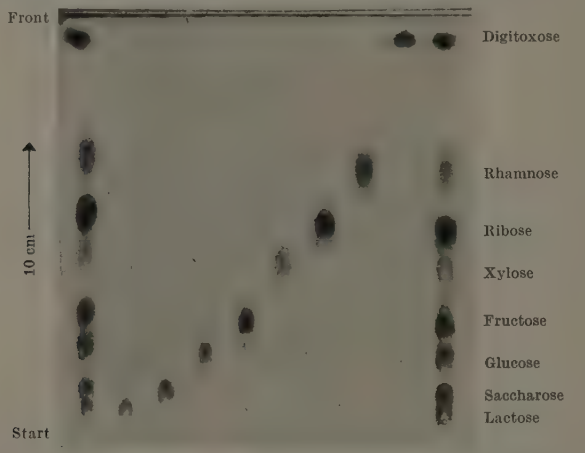


Abb. 4. Dünnschicht-Chromatogramm von Zuckern (je 0,5 µg) auf einer gepufferten Kieselgur G-Schicht im Durchlicht gaufenommen; Laufzeit für die 10 cm-Trennstrecke 25—30 min[21]

Essigsäure (96%) auf Kieselgel G, genannt (Abb. 3). Die Laufzeit beträgt im Durchschnitt 35 min. Über weitere Einzelheiten und über die biologische Austestung berichten wir (KALDEWEY u. STAHL[10]) a. a. O.

Ebenfalls mit sauren Gemischen, z. B. Benzol + Methylacetat + 80%ige Ameisensäure (4:4:2), gelang die Auftrennung von im Pflanzenreich weitverbreiteten Gemischen aus α- und γ-Pyronderivaten (z. B. von Flavonoiden, Cumarinen usw.), aromatischen Hydroxysäuren, Anthracenderivaten und Polyphenolen (z. B. Gerbstoffen). Mit derartigen Elutionsgemischen konnten wir dann auf Kieselgel G-Schichten zahlreiche Arzneipflanzenauszüge (Tinkturen, Fluid- und Trockenextrakte) auftrennen und sie auf diesem Wege kennzeichnen (Stahl u. Schorn[32]). Als Testgemisch wurde eine Mischung von 3 Fluorescenzfarbstoffen (Fluorescein, Nilblau und Pyronin) verwendet.

Als extremes Beispiel aus dem hydrophilen Bereich sei abschließend die Schnelltrennung eines aus 8 Zuckern (je 0,5 μg) bestehenden Gemisches angeführt (Stahl u. Kaltenbach[31]). Sie gelang (Abb. 4) auf Kieselgur G-Schichten* (gepuffert mit 0,02 m Natriumacetat) mit Gemischen aus Essigsäureäthylester-Isopropanol-Wasser (z. B. 65:23,5:11,5 V/V).

Zusammenfassend darf jetzt schon gesagt werden, daß der Anwendungsbereich der Dünnschicht-Chromatographie von den schwach polaren Lipiden bis zu den stark polaren „Hydrophilen" reicht.

Literatur

[1] Barbier, M., H. Jäger, H. Tobias u. E. Wyss: Helv. chim. Acta **42**, 2440 (1959). — [2] Beckett, A. H., u. P. Anderson: Nature (London) **179**, 1074 (1957). — [3] Brieskorn, C.-H., u. E. Wenger: Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. **293**, 21 (1960). — [4] van Dam, M. J. D., G. J. de Kleuver u. J. G. de Heus: J. Chromatography (Amsterdam) **4**, 26 (1960). — [5] Demole, E.: Thèse Ser. A, No. 844, No. d'Ordre 870, Paris 1958; J. Chromatography (Amsterdam) **1**, 24 (1958); vgl. diese Z. **164**, 413 (1958). — [6] Hais, I. M., u. K. Macek: Handbuch der Papierchromatographie, Fischer, Jena 1958. — [7] Hecker, E.: Chimia (Zürich) 8, 229 (1954). — [8] Hoffmann-La Roche A.G. Basel: Privatmitteilungen. — [9] Ismailow, N. A., u. M. S. Schraiber: Farmazia (russ.)** No. **3**, 1 (1938). — [10] Kaldewey, H., u. E. Stahl: unveröffentlicht. — [11] Kirchner, J. G., J. M. Miller u. G. J. Keller: Analyt. Chemistry **23**, 420 (1951); vgl. diese Z. **136**, 370 (1952). — [12] Liebich, H.: Dtsch. Apotheker-Ztg. **99**, 1246 (1959); **100**, 393 (1960); vgl. diese Z. **177**, 230, 231 (1960). — [13] Machata, G.: Mikrochim. Acta (Wien) **47**, 79 (1960). — [14] Mangold, H. K.: Fette u. Seifen **61**, 877 (1959) und Privatmitteilungen; vgl. diese Z. **176**, 229 (1960). — [15] Mangold, H. K., u. D. C. Malins: J. Amer. Oil Chemists' Soc. 1960, im Druck. — [16] Merck, E.: Druckschrift: Aluminiumoxid G, Kieselgel G, Kieselgur G für die Dünnschicht-Chromatographie, Darmstadt 1960. — [17] Mottier, M.: Mitt. Gebiete Lebensmittelunters. Hyg. (Bern) **49**, 454 (1958); vgl. diese Z. **174**, 319 (1960). — [18] Mutschler, E., u. H. Rochelmeyer: Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. **292**, 449 (1959); vgl. diese

* Seit 1959 neben Kieselgel G und Aluminiumoxid G im Herstellungsprogramm der Fa. E. Merck, Darmstadt[16].

** Für die Beschaffung und Übersetzung danke ich den Herren Dr. H. Bolliger und Dr. E. Würgler bestens.

Z. **177**, 388 (1960). — [19] Nürnberg, E.: Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. **292**, 610 (1959). — [20] Reitsema, R. H.: Analyt. Chemistry **26**, 960 (1954); vgl. diese Z. **145**, 449 (1955). — [21] Schlemmer, F., u. L. Link: Pharmaz. Ztg. **104**, 1349 (1959). — [22] Seher, A.: Fette u. Seifen **61**, 345 (1959); vgl. diese Z. **174**, 373 (1960). — [23] Stahl, E.: (I. Mitt.) Pharmazie **11**, 633 (1956). — [24] Stahl, E.: (II. Mitt.) Chemiker-Ztg. **82**, 323 (1958); vgl. diese Z. **173**, 458 (1960). — [25] Stahl, E.: (III. Mitt.) Parfümerie u. Kosmet. **39**, 564 (1958). — [26] Stahl, E.: (IV. Mitt.) Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. **292**, 411 (1959). — [27] Stahl, E.: (V. Mitt.) Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. **293**, 531 (1960). — [28] Stahl, E.: Pharmaz. Rdsch. **1**, No. 2, 1 (1959). — [29] Stahl, E.: unveröffentlicht, z. T. vorgetragen 1958—1960 Dtsch. Pharmaz. Ges. s. Ref. — [30] Stahl, E., u. H. Kaldewey: unveröffentlicht. — [31] Stahl, E., u. U. Kaltenbach: (VI. Mitt.) J. Chromatography (Amsterdam) **5**, 351 (1961). — [32] Stahl, E., u. P. J. Schorn, unveröffentlicht. — [33] Stahl, E., u. L. Trennheuser: Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. **293**, 826 (1960). — [34] Teichert, K., E. Mutschler u. H. Rochelmeyer: Dtsch. Apotheker-Ztg. **100**, 283, 477 (1960); vgl. diese Z. **178**, 49 (1960). — [35] Waldi, D., u. F. Munter: Med. Experiment. (Schweiz), im Druck. — [36] Weikker, H.: Klin. Wschr. **37**, 763 (1959). — [37] Wenger, E.: Diss. Tübingen 1960. — [38] Winkler, W., u. E. Lunau: Pharmaz. Ztg. **104**, 1407 (1959). — [39] Winterstein, A., u. B. Hegedüs: Chimia (Zürich) **14**, 18 (1960). — [40] Wulff, H. D., u. Egon Stahl: Naturwissenschaften **47**, 114 (1960). — [41] Zechmeister, L., u. L. v. Cholnoky: Die chromatographische Adsorptionsanalyse. Wien: Springer 1938.

Literaturnachtrag (Veröffentlichungen, die im Zeitraum der Drucklegung erschienen sind). [42] Brenner, M., u. A. Niederwieser, Experientia (Basel) **16**, 378 (1960). — [43] Fischer, R., u. W. Klingelhöller: Arch. Toxikologie (im Druck). — [44] Gänshirt, G.: Naturwissenschaften **47**, 279 (1960). — [45] Gänshirt, G., u. Mitarb.: Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. **293/65**, 925 (1960). — [46] Gauglitz jr., E. J., u. D. C. Malins: J. Amer. Oil Chemist's Soc. **37**, 425 (1960). — [47] Gruger jr., E. H., D. C. Malins u. E. J. Gauglitz jr.: J. Amer. Oil Chemists' Soc. **37**, 214 (1960). — [48] Hofmann, A., u. H. Tscherter: Experientia (Basel) **16**, 414 (1960). — [49] Hörhammer, L., H. Wagner u. B. Lay: Pharmazie **15**, 645 (1960). — [50] Jatzkewitz, H.: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **320**, 134 (1960). — [51] Jatzkewitz, H., u. E. Mehl: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **320**, 251 (1960). — [52] Kaufmann, H. P., u. Z. Makus: Fette-Seifen-Anstrichmittel **62**, 1014 (1960). — [53] Malins, D. C., u. H. K. Mangold: J. Amer. Oil Chemists' Soc. **37**, 576 (1960). — [54] Morris, L. J., R. T. Holman and K. Fontell: J. Amer. Oil Chemists' Soc. **37**, 323 (1960). — [55] Nicolaus, B. J. R.: J. Chromatog. **4**, 384 (1960). — [56] Peereboom, J. W. C.: J. Chromatog. **4**, 323 (1960). — [57] Stahl, E., u. U. Kaltenbach: Helv. Chim. Acta (im Druck). — [58] Wagner, H.: Vortrag Dtsch. Ges. f. Fettwissensch. Hamburg Okt. 1960, Ref. Pharmaz. Ztg. **105**, 1340 (1960). — [59] Waldi, D., K. Schnackerz u. F. Munter: J. Chromatog. (im Druck). — [60] Zachau, H. G., u. W. Karau: Chem. Ber. **93**, 1830 (1960).

Dozent Dr. E. Stahl, Botanisches Institut der Universität des Saarlandes, Saarbrücken 15

Institut für Spektrochemie und angewandte Spektroskopie, Dortmund-Aplerbeck, in Verbindung mit der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Quantitative Mehrkomponentenanalysen

II. IR- und UV-Chromatographie*

Von

G. Bergmann, H. Spieker und F. Zöhrer

Mit 8 Textabbildungen

(Eingegangen am 24. Januar 1961)

Die Chromatographie als analytisches oder präparatives Trennverfahren hat ihren Namen von der Ausbildung farbiger Zonen bei der Trennung gefärbter Substanzen, speziell des Chlorophylls[9], erhalten. Der einmal gewählte Name wurde auch dann beibehalten, als die Methode auf ungefärbte Körper ausgedehnt und an Stelle von Flüssigkeiten als bewegliche Phasen auch Gase angewandt wurden. Die Trennung ungefärbter, d.h. im sichtbaren Spektralgebiet nicht absorbierender Substanzen bedingt, daß man ein geeignetes chemisches oder physikalisches Nachweisverfahren zur Identifizierung der einzelnen Gemischkomponenten verwendet, mit dem sich der Verlauf des Trennprozesses verfolgen läßt. Unter den vielen hierzu denkbaren und benutzten Verfahren zeichnen sich die optischen Methoden durch besondere Empfindlichkeit und Selektivität aus. Mit ihnen wird das chromatographische Verfahren auf seine ursprüngliche Methodik im engeren Sinne, die „Farb(auf)zeichnung", zurückgeführt, wenn man den Begriff Farbe im weiteren Sinne auffaßt und die Lichtabsorption im infraroten und im ultravioletten Bereich mit einbezieht.

Die Stufen des chromatographischen Prozesses

Ein chromatographisches Verfahren gliedert sich in drei Abschnitte:

1. in den eigentlichen Trennprozeß (Fraktionierung);
2. in die Identifizierung und Lokalisierung der einzelnen Komponenten;
3. in die quantitative Analyse der gewonnenen Fraktionen.

Der *Trennprozeß* besteht in der Auftrennung eines Substanzgemisches durch Austausch zwischen einer mobilen flüssigen oder gasförmigen Phase und einer stationären festen oder flüssigen Phase, gegebenenfalls auf einem festen Trägermaterial. Die stationäre Phase kann z.B. in der

* I. Mitteilung: Bergmann, G., u. D. Jentzsch: diese Z. **164**, 10 (1958).

Form einer Trennsäule oder auch in dünner Schicht (Papier-, Dünnschicht-Chromatographie) angeordnet sein. Die folgenden Ausführungen beschränken sich auf die Säulenchromatographie, wenngleich die Übertragung auf andere Systeme möglich ist. Sofern die einzelnen Gemischpartner unterschiedliche Verteilungs- oder Adsorptionskoeffizienten im verwendeten System besitzen, bleiben die einzelnen Komponenten mehr oder weniger hinter der Front der mobilen Phase zurück. Im Verlaufe des Trennprozesses erhält man so eine räumliche Trennung über die Länge der Säule oder, wenn man durch genügend lange Fortsetzung alle Partner am Säulenende austreten läßt, eine zeitliche Folge des Austritts, die man z. B. durch die Retentionszeit beschreiben kann. Hierbei ist es zunächst ohne Belang, ob die Auftrennung unter gegenseitiger Verdrängung der Partner oder durch Elution mit einem geeigneten Lösungsmittel, das im Falle der Gaschromatographie auch ein Gas sein kann, erfolgt.

Die *Lokalisierung* und *Identifizierung* der einzelnen Komponenten ist zwangsläufig mit dem Trennprozeß gekoppelt. Nur die sorgfältige Auswertung eines Chromatogramms gestattet, die Wirksamkeit der Trennung zu beurteilen und die volle Trennschärfe auszunutzen. Zur Bestimmung der örtlichen Verteilung der einzelnen Substanzen zu einem bestimmten Zeitpunkt oder aber des zeitlichen Verlaufs ihres Austritts aus der Säule können sowohl chemische wie physikalische Verfahren benutzt werden. Unter den chemischen Verfahren haben sich besonders Titrations- und Anfärbereaktionen eingeführt, jedoch bereitet die Rückgewinnung der Ausgangssubstanzen aus den Reaktionsprodukten gelegentlich Schwierigkeiten. Ihnen gegenüber haben die physikalischen Methoden den Vorteil, daß sie „*zerstörungsfrei*" angewendet werden können und darüber hinaus oft eine *kontinuierliche* Messung der Konzentrationsverteilung gestatten. Dies ist besonders dann von Interesse, wenn man optimale Fraktionsgrößen und -zahlen gewinnen will. Solange man „blind" arbeitet, d. h. zunächst viele kleine Fraktionen sammelt und sie erst später auf ihren Gehalt qualitativ und quantitativ untersucht, muß man einen erheblich höheren Arbeitsaufwand in Kauf nehmen. Man läuft sonst Gefahr, durch zu großzügig geschnittene Fraktionen das wieder zu vereinigen, was in der Säule gerade aufgetrennt wurde. Bei unmittelbarer Messung und Registrierung des Konzentrationsverlaufes am Austritt der Säule läßt sich dagegen die Anzahl der später auszuwertenden Fraktionen weitgehend beschränken.

Die geringe Selektivität der physikalischen Methoden ist gelegentlich von Nachteil. Sofern man sich auf die Messung *einer* physikalischen Eigenschaft beschränkt, läßt sich nicht mit Sicherheit zwischen Rein- und Mischfraktionen unterscheiden. Dieses gilt insbesondere für den Fall der Elutionschromatographie, wo neben den Eigenschaften der interessie-

renden Substanzen auch die der Elutionsmittel gemessen werden und oft nur ein kleiner differentieller Effekt beobachtet wird. Beispiele hierfür sind die Messung des Brechungsindex, der Dielektrizitätskonstanten, des p_H-Wertes, der elektrischen und der Wärmeleitfähigkeit und andere. In den Absorptionsspektren steht aber nun ein zweidimensionales System von Materialkonstanten für jede einzelne Komponente zur Verfügung, das eine sichere Indentifizierung der einzelnen Fraktionen selbst in den Fällen erlaubt, in denen die Trennung nur unvollständig gelungen ist. Wenn bereits der Ersatz der ursprünglich visuellen Beobachtung der Farbzonen durch ein objektives photometrisches Meßverfahren einen beträchtlichen Gewinn bedeutet, vor allem wegen der Möglichkeit, über die Grenzen des sichtbaren Spektralgebietes hinauszugehen, so liefert die Bestimmung der *spektralen Verteilung* der Lichtabsorption ein unvergleichlich höheres Maß an Information.

Neben der Lichtabsorption können mit Erfolg auch andere optische Materialeigenschaften wie Fluorescenz- und Streuspektren benutzt werden.

Die *quantitative Analyse* der Fraktionen ist nicht zwingend mit einem chromatographischen Prozeß gekoppelt; besonders bei präparativem Arbeiten verzichtet man oft auf die Bestimmung der Menge an Einzelsubstanzen. In der Analyse ist jedoch dieser Schritt meist der umständlichste und zeitraubendste. Auch hier lassen sich die optischen Methoden mit gutem Erfolg einsetzen. Sofern es gelingt, Identifizierung und quantitative Bestimmung durch unmittelbare Auswertung des Chromatogramms miteinander zu verbinden und damit die Auswertung vieler Einzelfraktionen zu vermeiden, wird die Chromatographie nicht nur bezüglich ihres „Auflösungsvermögens", d. h. der Fähigkeit, chemisch oder physikalisch ähnliche Substanzen voneinander zu trennen, sondern auch hinsichtlich ihres Zeit- und Arbeitsaufwandes anderen analytischen Prozessen weit überlegen.

Im folgenden soll an einigen Beispielen gezeigt werden, wie durch zweckmäßige Kombination eines chromatographischen Trennverfahrens mit einer kontinuierlichen optischen Messung des Eluats direkt auswertbare Chromatogramme gewonnen werden können.

UV-Chromatographie von Phenolhomologengemischen

Monochromatische Chromatogramme

Die Bestimmung des Phenols, der isomeren Kresole sowie einiger Xylenole in technischen Gemischen findet Interesse sowohl in der Zwischenproduktherstellung als auch bei der Untersuchung technischer Abwässer. Zahlreiche Verfahren hierzu sind bekannt[4,6-8]. So läßt sich z. B. ein technisches Phenolhomologengemisch C_6—C_8 durch Verteilungschromatographie im System Cyclohexan/Wasser auf Silicagel

weitgehend auftrennen[5]. m- und p-Kresol sowie einige Xylenole bilden allerdings Mischfraktionen.

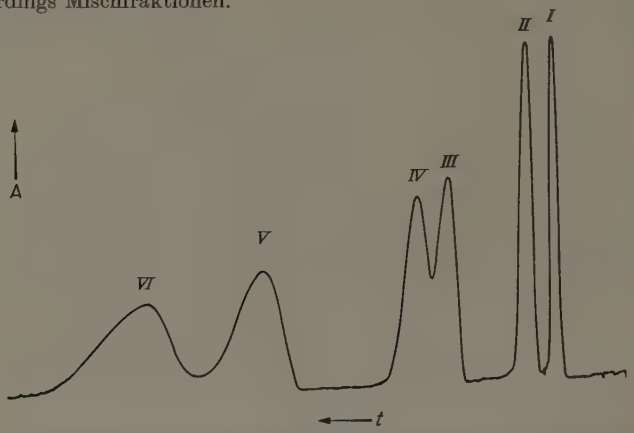


Abb. 1. Chromatogramm eines Kresol-Xylenolgemisches (Schichtdicke 2 mm, Durchflußgeschwindigkeit 2,5 ml/min; System Cyclohexan/Wasserglas-Wasser-Celit). *I* 2,6-Xylenol 0,836 mg; *II* 2,3-Xylenol 0,873 mg; *III* 3,5-Xylenol 0,773 mg; *IV* o-Kresol 0,802 mg; *V* p-Kresol 0,740 mg; *VI* m-Kresol 0,892 mg

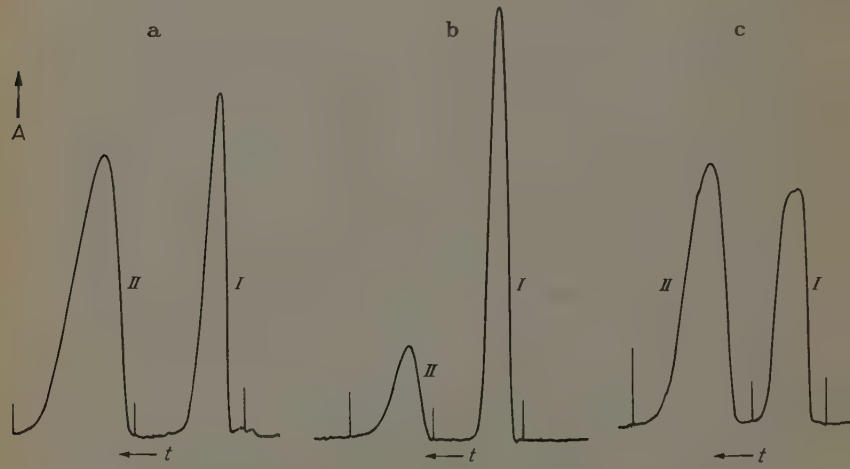


Abb. 2 a—c. Chromatogramme von Xylenol-Gemischen. (Arbeitsbedingungen wie in Abb. 1). a 36000 cm^{-1} (Konz.-Verh.: 1 : 1); b 36000 cm^{-1} (Konz.-Verh.: 10 : 1); c 35000 cm^{-1} (Konz.-Verh.: 10 : 1). *I* 2,3-Xylenol; *II* 3,4-Xylenol

Mit wasserglashaltigem Celit als stationärer Phase lassen sich jedoch alle Kresolisomeren voneinander trennen[2]. Abb. 1 gibt ein Beispiel für

die Chromatogramme, die wir unter Modifizierung der bereits früher gegebenen Arbeitsvorschrift* erhielten.

Der Austritt der einzelnen Komponenten aus der Säule wurde in einer Durchflußküvette (Schichtdicke 2 mm) photometrisch verfolgt (Spektralphotometer M4Q, Zeiss), indem die Absorption des Eluats bei 37000 cm^{-1} ($\lambda = 270$ nm) über die Zeit registriert wurde. Die Durchflußgeschwindigkeit wurde durch einen Druckregler am Kopf der Säule konstant gehalten (2,5 ml/min), die gesamte Durchlaufzeit betrug etwa 1 Std. Die Wellenzahl wurde so ausgewählt, daß etwa gleiche Empfindlichkeit der Anzeige für alle Komponenten erreicht wurde. Dieses ist naturgemäß nur angenähert möglich, da sich isosbestische Punkte, bei denen die Extinktionskoeffizienten gleich sind, zwar in der Regel für binäre Gemische finden lassen, bei Vielkomponentensystemen aber nur durch etwa übereinstimmende Bereiche der Extinktionskoeffizienten ersetzt werden können. Durch geschickte Wahl der Meßpunkte lassen sich andererseits in günstigen Fällen Reinheitsuntersuchungen mit hoher Empfindlichkeit ausführen. In Abb. 2 sind 3 bei verschiedenen Wellenzahlen gewonnene Chromatogramme einander gegenübergestellt. Ein Gemisch aus 3,4- und 2,3-Xylenol zeigt bei 36000 cm^{-1} (278 nm) etwa übereinstimmende Ausschläge, wenn das Konzentrationsverhältnis 1:1 beträgt (a); beim Übergang zum Konzentrationsverhältnis 1:10 nimmt das zum 3,4-Xylenol gehörige Signal entsprechend ab (b). Wählt man nun aber mit 35000 cm^{-1} (286 nm) ein Absorptionsmaximum des 3,4-Xylenols aus, bei dem der zugehörige Extinktionskoeffizient des 2,3-Xylenols erheblich kleiner ist, so erhält man trotz des extremen Konzentrationsverhältnisses wieder übereinstimmende Signale (c).

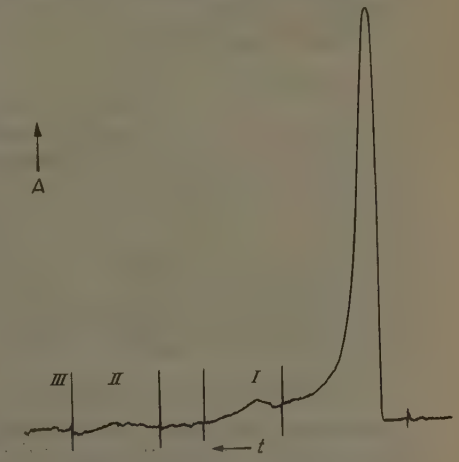


Abb. 3. Chromatogramm der Kresolisomeren aus Abwasser (je 0.01 mg/l, Arbeitsbedingungen wie in Abb. 1). *I* o-Kresol; *II* p-Kresol; *III* m-Kresol

Die Untersuchung von technischen Abwässern läßt sich in ähnlicher Weise ausführen, dabei muß bei geringem Phenolgehalt der chromatographischen Auftrennung eine extraktive Anreicherung vorangehen. Durch Ätherextraktion eines angesäuerten Wassers und nachfolgende alkalische Rückgewinnung erhält man bei 0,01 mg Kresol/l noch genügend Material für eine chromatographische Trennung (Abb. 3).

In Abb. 4 sind die Absorptionsspektren der einzelnen Fraktionen in 25facher Schichtdicke (50 mm) dargestellt, durch Vergleich mit den Spektren der reinen

* Eine Zusammenstellung der Arbeitsvorschriften wird in Kürze an anderer Stelle erscheinen. Beispiele für die Anwendung zur Routineanalyse wurden bereits von H. Kienitz, Chem.-Ing.-Techn. **32**, 641 (1960) gegeben.

Komponenten lassen sich die Proben leicht identifizieren. Die Nachweisgrenze kann bei den angegebenen Arbeitsbedingungen in günstigen Fällen mit etwa 10^{-9} Teilen jedes der Kresolisomeren oder auch des Phenols in 1 Teil Abwasser angegeben werden. Sie wird durch die Schwankungen der Meßeinrichtung, vor allem aber durch Schwankungen des Untergrundes bestimmt. Diese führen zum größten Teil von weiteren, nicht im einzelnen aufgeklärten Beimischungen des Abwassers und der benutzten Lösungsmittel her, die im untersuchten Spektralgebiet absorbieren und nur langsam und unregelmäßig von der — im allgemeinen viele Male benutzten — Säule eluiert werden.

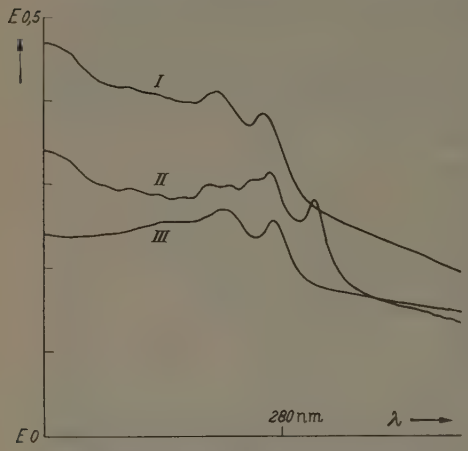


Abb. 4. Extinktionskurven von Kresolfraktionen aus Abb. 3 (Schichtdicke 50 mm). *I* o-Kresol; *II* p-Kresol; *III* m-Kresol

Polychromatische Chromatogramme

Die genannten Beispiele, in denen die Absorption der Eluate jeweils bei festeingestellter Wellenzahl untersucht wurde, sind charakteristisch für Routineanalysen, bei denen Sicherheit über die Art und Zahl der Komponenten besteht. Wenn dieses nicht der Fall ist, wird man mit Vorteil

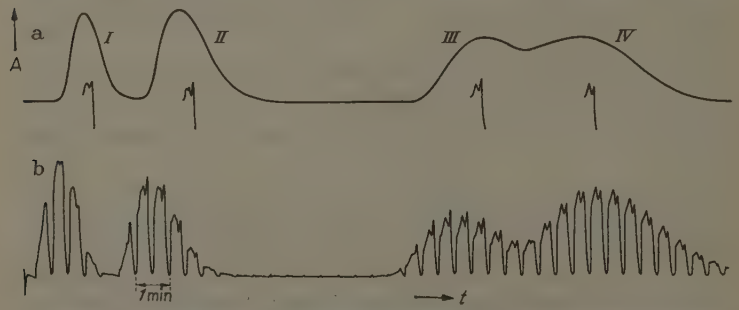


Abb. 5 a und b. Chromatogramme eines Kresol-Xylenolgemisches (Arbeitsbedingungen wie in Abb. 1). a monochromatisch 37000 cm^{-1}; b polychromatisch 35500—37500 cm^{-1} (Dauer eines Cyclus 30 sec). *I* 2,6-Xylenol; *II* 2,3-Xylenol; *III* 3,5-Xylenol; *IV* o-Kresol

den spektralen Verlauf der Absorption des Eluats untersuchen. Dabei muß die Schrittfolge der Messung der zu erwartenden Änderung in der Zusammensetzung des Eluats angepaßt sein, wie dies in Abb. 5 dar-

gestellt ist. Dem in einem registrierenden Spektralphotometer (Mod. 13 U, Perkin-Elmer) bei 37000 cm^{-1} gewonnenen Chromatogramm (a) ist ein solches gegenübergestellt, bei dem das Intervall zwischen 35500 und 37500 cm^{-1} innerhalb von 30 sec periodisch durchlaufen wurde (b). Die Identifizierung der einzelnen Fraktionen gelingt hier mit Hilfe der gleichfalls angegebenen Spektren der Reinkomponenten. An den Flanken des Chromatogramms wird die Darstellung der einzelnen Absorptionsspektren wegen der während der Messung erfolgenden schnellen Änderung der Konzentration unübersichtlicher; die insgesamt erhaltene Information ist jedoch der aus dem monochromatischen Chromatogramm überlegen.

Quantitative Auswertung

Es bereitet im allgemeinen keine Schwierigkeiten, die völlig voneinander getrennten Komponenten quantitativ zu bestimmen, indem man die Extinktion der gesamten Fraktion bei geeigneter Wellenzahl in einem Spektralphotometer mißt und nach dem Beerschen Gesetz die Konzentration und schließlich die Menge jeder einzelnen Komponente ermittelt. Dasselbe Verfahren ist auch für Fraktionen mit mehreren, nicht voneinander getrennten Komponenten anwendbar, sofern man hierfür die bekannten Regeln der spektralphotometrischen Mehrkomponentenanalyse ansetzt. Oft liefert aber bereits die unmittelbare Auswertung der Chromatogramme eine hinreichend genaue quantitative Analyse des Eluats:

Die in jedem kleinen Volumenelement dV des Eluats, das aus der Säule austritt — und die Durchflußküvette durchsetzt, — enthaltene Menge dm berechnet sich aus der jeweiligen Konzentration zu

$$dm = c \cdot dV.$$

Die Konzentration läßt sich nach dem Beerschen Gesetz durch Messung der Extinktion E ermitteln gemäß

$$c = \frac{E \cdot M}{d \cdot \varepsilon} = \frac{-\log D}{d \cdot \varepsilon} \cdot M$$

mit ε = Extinktionskoeffizient der betrachteten Substanz bei der gewählten Wellenzahl; d = Schichtdicke; D = Durchlässigkeit der Probe und M = Molekulargewicht.

Hieraus erhält man die Gesamtmenge m

$$m = \int dm = \frac{M}{d \cdot \varepsilon} \int E \cdot dV$$

Solange die Strömungsgeschwindigkeit $\frac{dV}{dt} = \dot{V}$ konstant gehalten wird, liefert die Integration der Extinktion über die Zeit unmittelbar

ein der eingesetzten Substanzmenge proportionales Maß

$$m = \frac{M}{\varepsilon d} \int E \frac{dV}{dt} \cdot dt = \frac{M \cdot \dot{V}}{\varepsilon \cdot d} \int E dt.$$

In Abb. 6 ist über einem Chromatogramm (a) die zugehörige Integralkurve (b) dargestellt, wobei die Ablesegenauigkeit durch mehrfache Skalendehnung erhöht wurde.

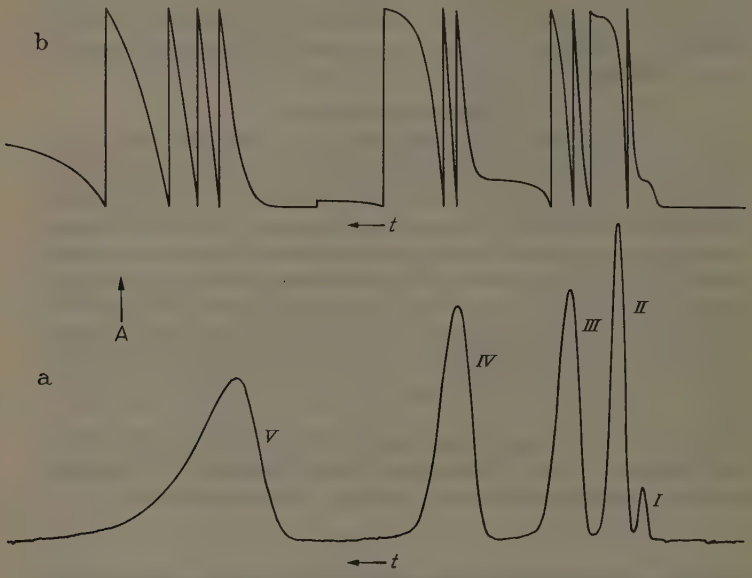


Abb. 6 a und b. Chromatogramm eines Kresol-Xylenolgemisches (System Cyclohexan/Wasser-Silicagel). a Chromatogramm; b Integralkurve (die Papiervorschübe stimmen nur angenähert überein). *I* Naphthalin; *II* 2,6-Xylenol; *III* 2,4-Xylenol; *IV* o-Kresol; *V* m- + p-Kresol

Die Integration wurde mit einem RC-Integrator vorgenommen, die erforderliche Transformation des zunächst gemessenen Durchlässigkeitswertes mit einem logarithmischen Potentiometer hoher Genauigkeit. Das — hier nicht aufgetrennte — m/p-Kresol-Gemisch kann nur als Summe beider Komponenten bestimmt werden. Die Summe ist nur dann vom jeweiligen Konzentrationsverhältnis der beiden Isomeren unabhängig, wenn die Messung bei der Wellenzahl eines isosbestischen Punktes ausgeführt wird.

Automatische Analyse

Wenn es — wie in den beschriebenen Fällen — gelingt, die einzelnen Komponenten völlig oder doch zumindest weitgehend voneinander zu trennen, bereitet die Auswertung eines Chromatogramms keine Schwierigkeiten. Oft ist dies aber nur nach langwieriger Ausarbeitung eines

geeigneten Trennprozesses durch umfangreiche Variation der Arbeitsbedingungen möglich. Hiermit ist meist ein erheblicher Zeit- und Arbeitsaufwand verbunden, der insbesondere durch die erforderliche Verlängerung der Trennsäulen und den geringen Durchsatz bedingt ist. Zeit und Arbeit kann man aber sparen, wenn es möglich ist, die Zusammensetzung des Eluats auch dann unmittelbar kontinuierlich zu bestimmen, wenn dieses aus mehreren Komponenten besteht und sich ihr Mengenverhältnis mit der Zeit ändert. Eine Anordnung, die dieses Problem löst, wurde von uns kürzlich beschrieben[3].

In einem automatischen, schrittweisen Verfahren wird nacheinander im Cyclus die Extinktion des Eluats bei so vielen Wellenzahlen gemessen, wie verschiedene Komponenten gleichzeitig vorkommen. Die Extinktionswerte werden als proportionale Spannungen in ein Analogrechengerät übertragen und dort gespeichert. Am Ausgang des Rechengerätes können die zugehörigen Konzentrationen als Spannungen abgegriffen und fortlaufend oder punktweise registriert werden.

UV-Chromatographie von Aromatengemischen

Ein Beispiel für die Untersuchung eines schlecht getrennten Gemisches von 3 Aromaten gibt Abb. 7a. Hier ist ein Chromatogramm für das System p-Xylol-Naphthalin-Phenanthren wiedergegeben, das unter absichtlich ungünstigen Bedingungen gewonnen wurde. (Es sei hier bemerkt, daß es bei nur geringem Mehraufwand an Zeit und Mühe gelingt, die 3 Komponenten einwandfrei voneinander zu trennen. Hier war aber gerade das Studium eines ungünstigen Systems beabsichtigt.) Abb. 7b zeigt dagegen das Ergebnis der kontinuierlichen automatischen Analyse desselben Systems mit Hilfe des genannten Analogrechenprozesses. Die einzelnen Balkenhöhen geben jeweils unmittelbar die Konzentrationen der 3 Partner an, die Gesamtmenge jeder der 3 Komponenten läßt sich durch Integration unterhalb der — nachträglich gezeichneten — Umhüllungskurven oder auch — näherungsweise — durch Addition der Balkenhöhen ermitteln. Nach diesem Verfahren ist es also möglich, unter Verzicht auf extreme Trennschärfe, einwandfreie qualitative und quantitative Analysen auch schwer trennbarer Gemische auszuführen. Einige Daten für die Reproduzierbarkeit des Verfahrens gibt die Tabelle.

Tabelle. *Automatische UV-Analyse von Dreikomponentengemischen*

	Probe 1 %		Probe 2 %	
p-Xylol	74,4	74,9	55,4	54,9
	74,9			
Naphthalin	13,1	12,6	40,8	41,2
Phenanthren	12,5	12,5	3,7	3,9

IR-Chromatographie von Benzolhomologen

Während es bei der Elutionschromatographie noch meist gelingt, Zwischenfraktionen aufzufangen, die nur wenig von den zu trennenden Substanzen enthalten oder gar aus reinem Elutionsmittel bestehen, folgen bei der Verdrängungschromatographie die einzelnen Komponenten unmittelbar aufeinander. Gerade hier scheint ein automatisches Auswerteverfahren besonders angezeigt. Abb. 8 gibt ein Beispiel für die Analyse eines Dreikomponentensystems, wie es nach der Methode der

Abb. 7a und b. Chromatogramm eines Aromatengemisches (System: Cyclohexan/Silicagel), a monochromatisch, 36400 cm^{-1}; b automatische UV-Analyse.
I p-Xylol; *II* Naphthalin; *III* Phenanthren

FIA-Analyse[1] anfiel. Die stark ineinanderlaufenden Komponenten wurden mit Hilfe ihrer IR-Absorptionsbanden bei 700—900 cm^{-1} (Spektralphotometer Modell 13 U, Perkin Elmer) bestimmt. Gleichzeitig wurde die Summe der 3 Konzentrationen im gleichen Analogrechengerät ermittelt, so daß die prozentuale Verteilung der Komponenten während des Elutionsprozesses in einfacher Weise bestimmt werden kann. Die exakte Auswertung der einzelnen Fraktionen bei nur teilweiser Auftrennung enthebt uns also in Zukunft der Spekulation, wie eine solche „Bande" des Chromatogramms auf die verschiedenen Partner aufzuteilen ist, ein Verfahren, das bislang zwar mit großer Unbekümmertheit, aber ohne besondere Zuverlässigkeit geübt wurde.

Abschließend sei bemerkt: das Analogrechengerät in seiner jetzigen Anordnung erlaubt die Berechnung von Systemen mit 4—5 Komponenten. Dabei wird die Matrix der Extinktionskoeffizienten in Form eines einsteckbaren Satzes von Ohmschen Widerständen eingegeben. Das Gerät läßt sich in dieser Weise sehr schnell für wechselnde Probleme

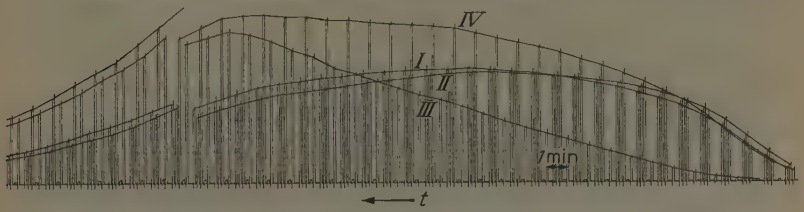


Abb. 8. Verdrängungschromatographische Analyse von Aromaten: Automatische IR-Analyse (System: Silicagel, Verdrängungsmittel: i-Propanol). *I* m-Xylol; *II* p-Xylol; *III* Toluol; *IV* $^1/_2$ · Summe ($I + II + III$)

programmieren, die Erweiterung auf umfangreichere Probleme bietet keine prinzipiellen Schwierigkeiten, insbesondere, da der Umfang der Einrichtung nur unwesentlich mit der Zahl der Komponenten ansteigt. Die Beschränkung der Zahl wird zur Zeit ausschließlich durch die photometrische Meßgenauigkeit gegeben, die eine übermäßige Erweiterung sinnlos erscheinen läßt.

Alle genannten Prozesse lassen sich in dieser Form selbstverständlich nur in solchen Spektralgebieten ausführen, in denen die einzelnen Komponenten absorbieren. Gesättigte Verbindungen können also nur im infraroten Spektralgebiet untersucht werden und nur dann, wenn die Konzentration im Eluat so groß wird, daß die Extinktion neben der des Elutionsmittels meßbar ist.

Bei den vorliegenden Arbeiten hatten wir uns der fleißigen und ideenreichen Mitarbeit von Herrn W. Körbächer, Frl. D. Hagmann und Frl. B. Schäfer zu erfreuen. Ihnen gebührt auch an dieser Stelle unser Dank.

Zusammenfassung

Es werden Methoden zur objektiven photometrischen Messung von Chromatogrammen beschrieben, nach denen durch Bestimmung der

IR- oder UV-Absorption des Eluats von chromatographischen Säulen der Verlauf der Trennung verfolgt werden kann.

Die quantitative Analyse wird durch unmittelbare Auswertung des Chromatogramms, z. B. durch Integration der Extinktion über die Zeit, vereinfacht, so daß sich das Auffangen einzelner Fraktionen erübrigt. Das Verfahren wird am Beispiel der Analyse von Phenolhomologen in technischen Gemischen und Abwässern beschrieben.

Durch ein automatisches Analogrechenverfahren in unmittelbarer Kopplung mit einem Spektralphotometer lassen sich Konzentration und Menge der einzelnen Komponenten im Eluat auch dann bestimmen, wenn nicht oder nur schlecht aufgetrennte Mehrkomponentengemische am Säulenende austreten. Beispiele für die Analyse von Aromatengemischen werden gegeben, die Grenzen der Anwendung des Verfahrens diskutiert.

Literatur

[1] ASTM — D 1319 — 56 T. — [2] Barker, L., u. N. W. Hollingworth: The Gas Council, Res. Comm. G. C. 52 (1958). — [3] Bergmann, G.: diese Z. (im Druck); Vorträge GDCh-Hauptversammlung Stuttgart 1960 und Bunsengedächtnisfeier Heidelberg 1960. — [4] Bergmann, G., u. D. Jentzsch: diese Z. **164**, 10 (1958). — [5] Bergmann, G., u. F. Zöhrer: Vortrag Fachgruppe Analytische Chemie, G. D. Ch.-Hauptversammlung Berlin 1957. — [6] Blackburn, W. H., L. Barker u. J. R. Catchpole: The Gas Council, Res. Comm. G. C. 17 (1954). — [7] Blackburn, W. H., L. Barker, J. R. Catchpole and N. W. Hollingworth: The Gas Council, Res. Comm. G. C. 24 (1955). — [8] Pearson, R. M.: Analyst **80**, 656 (1955); vgl. diese Z. **152**, 383 (1956). — [9] Tswett, M.: Ber. dtsch. bot. Ges. **24**, 316, 384 (1906).

Dr. Gerhard Bergmann, Dipl.-Ing. Helga Spieker und Dipl.-Ing. Franz Zöhrer, Institut für Spektrochemie u. angew. Spektroskopie, Dortmund-Aplerbeck, Marsbruchstr. 186, I

Geräte zur Ionenaustausch-Chromatographie im Mikromaßstab

Von

H. Schnitger*

(Referat)

Ein mit Zusatzeinrichtung für die Ionenaustausch-Chromatographie ausgestatteter Fraktionsschneider, der bei einwandfreier Auftrennung chromatographische Analysen mit $^1/_{10}$ bis $^1/_{100}$ der bisher benötigten Substanzmenge ermöglicht, wird demonstriert und erläutert. — Die Punkte, in denen die Apparatur und Methodik gegenüber der bislang üblichen geändert wurde, werden besprochen.

* Über das Gerät und seine Anwendungen vgl. Schnitger, H., K. Papenberg, E. Ganse, R. Czok, T. Bücher u. H. Adam, Biochem. Z. **332**, 167 (1959).

Dr. H. Schnitger,
Physiol.-Chem. Institut d. Universität Marburg/Lahn, Deutschhausstraße 1—2

Pharmazeutisches Institut der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. H. Rochelmeyer)

Die plattenchromatographische Untersuchung von Naturstoffgemischen

Von
K. Teichert, E. Mutschler und H. Rochelmeyer

(Eingegangen am 27. Oktober 1960)

In unserem Arbeitskreis beschäftigen wir uns mit Fragen um die Biogenese der Mutterkornalkaloide und die Existenz chemischer Rassen bei den Clavicipiteen. Voraussetzung für eine erfolgreiche experimentelle Bearbeitung dieser Probleme ist die analytische Erfassung aller Wirkstoffe aus der Droge.

Vor wenigen Jahren waren im Mutterkorn nur 12 Alkaloide bekannt. Heute sind etwa 25 Basen identifiziert. Zu den klassischen oder Peptidalkaloiden ist eine neue Reihe von Alkaloiden, die sogenannten Clavinalkaloide hinzugekommen. Bei Untersuchungen müssen naturgemäß beide Alkaloidreihen berücksichtigt werden, da nur dann exakte Aussagen über die genannten Fragen gemacht werden können. Der sichere Nachweis dieser 25 Substanzen bringt erhebliche analytische Schwierigkeiten. Diastereomere sind auseinanderzuhalten, oder es müssen Alkaloide getrennt werden, die sich bei einem Molekulargewicht von etwa 600 nur durch den Mehrbesitz von zwei Methylgruppen unterscheiden. Außer Alkaloiden enthält ferner ein Mutterkornextrakt Farbstoffe, Begleit- und Ballaststoffe, die den Nachweis der physiologisch wirksamen Substanzen ebenfalls erschweren. Die Analyse eines solch komplexen Naturstoffgemisches war daher vor der Einführung der Chromatographie eine nahezu unlösbare oder zumindest äußerst langwierige Aufgabe. Erst mit der papierchromatographischen Arbeitsweise wurde es möglich, mit mehreren Chromatogrammen wenigstens Teile der in einem Auszug enthaltenen Basen zu charakterisieren. Der Nachweis der „kleinen" Alkaloide vom Clavintyp blieb jedoch unsicher, da sie papierchromatographisch schwer zu trennen sind, ein Teil dieser Substanzen im UV-Licht nicht fluoresciert und eine empfindliche Nachweisreaktion für das Papierchromatogramm nicht vorhanden ist. Außerdem benötigt man für eine papierchromatographische Analyse noch immer 6—8 Std. Diese Zeit und der apparative Aufwand erscheint vor allem für Serienanalysen zu groß. Es mußte daher ein Verfahren gefunden werden, das diese Nachteile nicht aufweist.

Aussichtsreich erscheint die von Stahl[8] verbesserte Plattenchromatographie nach Kirchner, Miller u. Keller[4], welche durch ihre Schnelligkeit, durch die einfache Anwendung, den Einsatz geringster Stoffmengen und die geringe Empfindlichkeit gegenüber störenden Begleitsubstanzen besticht. Wir haben daher dieses Verfahren bei unseren Arbeiten eingesetzt und die Bedingungen für die Trennung von Alkaloiden und ionogenen Stoffen untersucht. Der erste Fortschritt in der Analyse von Mutterkornauszügen mit Hilfe der Plattenchromatographie wurde erreicht, als es uns gelang[7], auf Kieselgelplatten mit Gemischen aus Chloroform und Äthanol, bzw. Dimethylformamid, Essigester und Äthanol eine Trennung der Clavinalkaloide untereinander und ihre Abtrennung von den peptidischen Basen zu erreichen. Bemerkenswert ist auch, daß auf der Kieselgelplatte noch 0,1 μg an Alkaloid sicher nachgewiesen werden können.

Trotz zahlreicher Versuche mit einer großen Zahl von Lösungsmittelsystemen konnten auf Kieselgelplatten die Peptidalkaloide nur gruppenweise aufgetrennt werden. Eine Differenzierung der einzelnen Alkaloide jeder Gruppe, z.B. der Ergotamin- oder Ergotoxingruppe, war nicht möglich. Besonders für Reihenuntersuchungen erschien es aber wichtig, die „großen" Alkaloide ebenso schnell wie die „kleinen" nachweisen zu können. Aus diesem Grunde versuchten wir, Cellulosepulver als Trägerstoff einzusetzen. Möglicherweise war durch die Erhöhung der Teilchenzahl und der damit vergrößerten Oberfläche im Vergleich zum Papierchromatogramm eine schnellere und gleichzeitig im Verhältnis zur Laufstrecke bessere Trennung zu erreichen.

Mit einem Präparat besonders hoher spezifischer Oberfläche* gelang es uns tatsächlich, auf der kurzen Laufstrecke von 15 cm innerhalb von 30—40 min Trennungen zu erzielen, die von Papierchromatogrammen mit einer Laufstrecke von 40 cm und einer Laufzeit von mehreren Stunden nicht übertroffen werden. Die daraus sich ergebenden Vorteile sind offensichtlich. Papierchromatographische Trennungen können mit einem wesentlich geringeren Zeitaufwand auf der Cellulosepulverplatte durchgeführt werden. Die Nachweisgrenze der Substanzen wird erniedrigt, da auf der kurzen Laufstrecke die Flecken weniger auseinanderlaufen. Die Möglichkeit zu Umlagerungen, Oxydationen oder anderen chemischen Veränderungen, welche bei der Papierchromatographie auftreten können, wird durch die kurze Laufzeit weitgehend eingeschränkt[6].

Für die Trennung der „großen" Mutterkornalkaloide bewährt sich die Imprägnierung des Cellulosepulvers mit Formamid und eine Entwicklung mit dem Gemisch Benzol, Heptan, Chloroform (6:5:3). In diesem System lassen sich alle Peptidalkaloide auftrennen, selbst die

* „Cellulosepulver für analytische Chromatographie", Excorna Mainz, Untere Zahlbacherstraße.

schwierige Differenzierung von Ergocornin und Ergocristin gelingt einwandfrei. Die Ergometringruppe sowie die Clavine verbleiben auf Cellulosepulverplatten am Startpunkt und werden daher auf Kieselgelplatten charakterisiert. Wendet man Kieselgel- und Cellulosepulverplatten nebeneinander an, so ist es möglich, die vollständige Analyse eines Mutterkornauszuges in kurzer Zeit durchzuführen, wovon wir uns bei einigen tausend Bestimmungen überzeugen konnten.

Noch wertvoller wird das Verfahren für unsere Arbeiten dadurch, daß nicht nur Alkaloide, sondern auch Alkaloidbruchstücke und weitere im Mutterkorn vorhandene Inhaltsstoffe damit untersucht werden können. Eingangs wurde schon erwähnt, daß sich einige Alkaloide nur durch 2 Methylgruppen unterschieden. Genauer gesagt handelt es sich hierbei um den Einbau von Dimethylbrenztraubensäure an Stelle von Brenztraubensäure in das sonst gleichgebaute Alkaloidmolekül. Für die Konstitutionsaufklärung unbekannter Alkaloide der Peptidreihe ist daher die Unterscheidung dieser beiden Substanzen, die bei der alkalischen Hydrolyse der Alkaloide als Abbauprodukte anfallen, notwendig.

Papierchromatographisch wird meistens die α-Ketosäure in das 2,4-Dinitrophenylhydrazon überführt und dann mit Gemischen aus Butanol, Äthanol und Wasser entwickelt[2]. Der Nachweis ist wenig empfindlich. Begleitstoffe verursachen Schwanzbildung. Auf oxalsauren Kieselgelplatten konnten wir dagegen die freien Säuren mit einer Mischung aus Chloroform und Äthanol (9:1) trennen und noch 0,1 μg mit o-Phenylendiamin sicher nachweisen. Neben der Ersparnis an eingesetztem Material ließ sich die Hydrolysedauer der Alkaloide von 24 Std auf 2 Std verkürzen.

Aminosäuren und Amine, die als Bausteine der Alkaloide oder bei Stoffwechseluntersuchungen von Interesse sind, konnten wir selbst in solchen Extrakten sicher identifizieren, die auf Papierchromatogrammen infolge störender Begleitstoffe nicht untersucht werden konnten[6]. Unter anderem stellten wir hierbei erstmalig das Vorkommen von Äthanolamin im Mutterkorn fest[5].

Neben der qualitativen Analyse interessierte uns auch die quantitative Zusammensetzung des Alkaloidgemisches. Dabei fanden wir, daß eine quantitative Bestimmung der Alkaloide nach Elution aus dem Kieselgel oder dem Cellulosepulver möglich ist. Die Messung selbst kann spektralphotometrisch oder colorimetrisch erfolgen. Steht ein leicht durchzuführendes colorimetrisches Verfahren zur Verfügung, ziehen wir dieses auf Grund geringerer Fehlermöglichkeiten dem spektralphotometrischen trotz dessen Schnelligkeit vor.

Zur Bestimmung der Mutterkornalkaloide haben wir beide Arbeitsweisen untersucht. Spektralphotometrisch messen wir die „großen" Alkaloide, die nach ihrer Auftrennung auf Cellulosepulverplatten mit

einer Mischung von Dimethylformamid und Essigester (1:19) leicht extrahiert werden können. Die Clavinalkaloide werden dagegen besser nach Anfärben mit dem bekannten Reagens nach van Urk colorimetrisch gemessen, da sie nur schwer quantitativ aus dem Kieselgel eluierbar sind.

Die Genauigkeit der plattenchromatographischen Bestimmung ist analogen Messungen in der Papierchromatographie gleichwertig. Sie liegt bei den Hauptalkaloiden bei etwa $\pm 5\%$. Cellulosepulverplatte und Kieselgelplatte ergänzen sich wie bei der qualitativen Trennung vorzüglich. Für Clavinalkaloide sind Kieselgelplatten, für die klassischen Alkaloide Cellulosepulverplatten erforderlich. Der kombinierte Einsatz erfüllt alle notwendigen analytischen Voraussetzungen, er gewährt bei Anwendung eines geeigneten Extraktionsverfahrens in etwa 2 Std eine umfassende Aussage über die qualitative und quantitative Alkaloidzusammensetzung eines Mutterkornauszuges. Für die qualitative Untersuchung mit quantitativer Schätzung werden etwa 50 μg, für die exakte quantitative Bestimmung ungefähr 500 μg Gesamtalkaloide benötigt. Bedenkt man nochmals die zahlreichen Stoffe, die erfaßt werden müssen, ihre nur geringfügig verschiedene Konstitution, die Schwierigkeiten, die bisher einer solchen Analyse entgegenstanden, dann wird die Leistungsfähigkeit der Arbeitsweise besonders deutlich.

Genauso vorteilhaft kann die Plattenchromatographie auch zur Charakterisierung anderer Naturstoffgemische eingesetzt werden. Die Untersuchung zahlreicher Pflanzenauszüge ließ ihre allgemeine Brauchbarkeit zur Identifizierung von Drogen und Drogeninhaltsstoffen erkennen. Wiederum erwies sich die gemeinsame Anwendung von Kieselgel- und Cellulosepulverplatten als vorteilhaft, da ein Teil der Auszüge besser auf Cellulosepulverplatten, ein anderer besser auf Kieselgelplatten aufgetrennt werden konnte. Aus der großen Zahl der untersuchten Stoffe sollen einige charakteristische Beispiele von allgemeinem Interesse herausgegriffen werden.

Ähnliche Schwierigkeiten wie ein Mutterkornextrakt bereiten Opiumauszüge. Schwach basische, mittelstark basische, amphotere Alkaloide sind zu trennen, nachzuweisen und quantitativ zu bestimmen, ohne daß Farbstoffe, Peptide, Aminosäuren, Amine, Carbonsäuren mit erfaßt werden. Die meisten älteren Verfahren, z. B. die Vorschriften in den Pharmakopöen, begnügen sich mit einer Bestimmung des Morphins. Sie sind zudem Konventionsmethoden, deren Ergebnisse nicht als Absolutwerte angesehen werden können und nur dann übereinstimmen, wenn die Morphinkonzentration innerhalb gewisser Grenzen liegt. Die notwendigen Fällungen oder Ausschüttelungen von Nebenalkaloiden verursachen Verluste an Morphin, so daß Korrekturfaktoren eingesetzt werden müssen. Bei der Fällung des Morphins selbst besteht die Gefahr,

daß Begleitstoffe eine quantitative Fällung des Morphins verhindern oder mit dem Fällungsmittel unlösliche Verbindungen eingehen. Bei neueren säulenchromatographischen Bestimmungen sind diese Schwierigkeiten zwar umgangen, aber der Zeit- und Materialaufwand ist noch immer erheblich. Selbst bei der papierchromatographischen Untersuchung nach SVENDSEN[9] dauert die Trennung der Alkaloide Stunden.

Mit Hilfe der Plattenchromatographie können außer Morphin auch die wichtigsten Nebenalkaloide, die sonst bei den meisten anderen Verfahren überhaupt nicht erfaßt werden, schnell bestimmt werden.

Die qualitative Auftrennung wird auf alkalischen Kieselgelplatten mit dem Gemisch Chloroform und Äthanol (9:1) und auf formamidimprägnierten Cellulosepulverplatten mit Benzol, Heptan, Chloroform und Diäthylamin (6:5:3:0,03) durchgeführt. Die Störung des qualitativen Nachweises von Alkaloiden durch Formamid läßt sich auf einfache Weise dadurch beseitigen, daß das Chromatogramm vor dem Aufbringen von DRAGENDORFFS Reagens mit einer 0,25%igen Lösung von Natriumnitrit in 0,5%iger Salzsäure besprüht und dadurch das Formamid zu nicht störender Ameisensäure abgebaut wird. Höhere Nitritkonzentrationen sind zu vermeiden, da sonst überschüssige salpetrige Säure aus dem Reagens Jod freimacht, das die gesamte Cellulosepulverplatte braunschwarz anfärbt.

Die für die qualitative Untersuchung des Opiums genannten Lösungsmittel dienen auch als Trenngemische bei der quantitativen Bestimmung der Nebenalkaloide. Da Morphin in diesen Systemen nahe am Startpunkt verbleibt, und von Ballaststoffen noch nicht vollständig abgetrennt wird, erfolgt die Morphinbestimmung auf einer zweiten Platte. Als Entwicklungsgemisch verwendet man auf Kieselgelplatten Chloroform und Äthanol (3:1) und auf formamidimprägnierten Cellulosepulverplatten Benzol, Chloroform und Diäthylamin (2:3:0,02). Nach Chromatographie in einem der genannten Systeme kann die quantitative Bestimmung des Morphins spektralphotometrisch oder colorimetrisch erfolgen. Wegen des nicht sehr großen spezifischen Extinktionskoeffizienten ziehen wir bei Auszügen mit geringem Morphingehalt colorimetrische Verfahren[9] vor.

Eine vorherige Reinigung des üblicherweise verwandten Kieselgels G „Merck" ist erforderlich. Die für eine quantitative Elution des Morphins benötigten stark polaren Lösungsmittel lösen eine Reihe von Verunreinigungen, vor allem Eisensalze, aus dem Kieselgel heraus, die die quantitative Untersuchung stören. Durch wiederholtes Auskochen des Kieselgels mit schwefelsäurehaltigem Äthanol oder Verwendung eines reineren Produktes kann man diese Schwierigkeit beseitigen, und man erhält dann genaue, übereinstimmende Ergebnisse, die im Gegensatz zu den Werten der Arzneibücher als absolut angesehen werden können. Der apparative Aufwand und die eingesetzte Substanzmenge ist gering. Werden Extrakte aufgearbeitet, können Alkaloidkonzentrate und Mutterlaugen auf einfache Weise analysiert, isolierte Substanzen und synthetische Veredlungsprodukte auf ihren Reinheitsgrad überprüft werden.

Eine weitere Gruppe von Alkaloiden, die Purinalkaloide, interessieren neben dem pharmazeutischen Chemiker auch den Lebensmittelchemiker. Die Aufgabe, Kaffee-Extrakte, Erfrischungsgetränke, Tabletten, Dragees, Suppositorien auf ihren Gehalt an Coffein oder anderen Purinalkaloiden zu untersuchen, kann auf neutralen oder phosphatgepufferten Kieselgelschichten sicher und schnell gelöst werden. Der qualitative

Nachweis mit einer salzsauren Lösung von Jod-Jodkali ist sehr empfindlich[6], darüber hinaus färben sich die einzelnen Alkaloide verschieden an. Wird die spektralphotometrische Messung als Differenzbestimmung bei zwei verschiedenen Wellenlängen durchgeführt, erfüllt sie alle Anforderungen.

Ebenfalls spektralphotometrisch messen wir Capsaicin, den wirksamen Inhaltsstoff von Paprika nach Abtrennung von störenden Begleitstoffen auf Kieselgelplatten. Die nach Chromatographie mit Chloroform und Äthanol (99:1) gefundenen Ergebnisse waren außerordentlich genau. Im Vergleich zu der in „Chromatographie Merck" beschriebenen papierchromatographischen Methode ist die plattenchromatographische Bestimmung exakter, leichter durchzuführen und zeitsparender, da die Herstellung eines Vorchromatogramms wegfällt.

Um über die Alkaloide hinaus noch eine andere Stoffklasse zu erwähnen, sei als letztes Beispiel das zu den Glykosiden gehörende Aloin genannt, ein in zahlreichen Abführmitteln enthaltener Naturstoff, der in engster Verwandtschaft zu den Anthrachinonglykosiden steht. Die üblicherweise durchgeführte Gehaltsbestimmung nach Auterhoff u. Ball[1] beruht auf der Oxydation des Aloins durch Kochen mit Eisen-3-chlorid zu Emodin und der colorimetrischen Messung des daraus mit Natronlauge gebildeten roten Farbstoffes. Hörhammer u. Föcking[3] vereinfachten die Vorreinigung des Extraktes durch Verwendung einer Polyamidsäule und bestimmten dann das Aloin ebenfalls nach Auterhoff u. Ball[1]. Trotz dieser Verbesserung ist das Verfahren immer noch langwierig, da zur Oxydation mehrere Stunden benötigt werden und das gebildete Oxydationsprodukt mit Butanol ausgeschüttelt werden muß.

Die plattenchromatographische Bestimmung ist dagegen außerordentlich einfach und schnell: Der Extrakt wird in Methanol gelöst, mit Chloroform/Äthanol (3:1) entwickelt, die Aloinschicht abgeschabt, mit Äthanol eluiert und die klare Lösung spektralphotometrisch gemessen. In knapp 1 Std läßt sich die gesamte Untersuchung durchführen und ist zudem sehr genau. Beim Vergleich mit der Bestimmung nach Hörhammer u. Föcking[3] ergab sich eine gute Übereinstimmung der nach beiden Verfahren erhaltenen Werte.

Faßt man die geschilderten Versuche zusammen, so ergibt sich der Befund, daß die Cellulosepulverplatte in vielen Fällen dem Papierchromatogramm vorzuziehen ist, daß Kieselgelplatten zur Ergänzung und Erweiterung eingesetzt werden können. Vorteilhaft erscheint die Schnelligkeit und einfache Durchführung des Verfahrens, das eine hinreichende Genauigkeit ohne umständliche Vorreinigung der Extrakte gewährleistet und somit zu einer verbesserten Analytik der Naturstoffe beiträgt.

Literatur

[1] AUTERHOFF, H., u. B. BALL: Arzneimittelforsch. **4**, 725 (1954). — [2] HAIS, I. M., u. K. MACEK: Handbuch der Papierchromatographie I, Verlag Fischer Jena 1958, S. 255. — [3] HÖRHAMMER, L., u. O. FÖCKING: Pharmaz. Ztg. **104**, 1183 (1959). — [4] KIRCHNER, J. G., J. M. MILLER u. G. J. KELLER: Analyt. Chemistry **23**, 420 (1951); vgl. diese Z. **136**, 370 (1952). — [5] MUTSCHLER, E.: Diss. Mainz 1959. — [6] MUTSCHLER, E., u. H. ROCHELMEYER: Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. **292**, 449 (1959); vgl. diese Z. **177**, 388 (1960). — TEICHERT, K., E. MUTSCHLER u. H. ROCHELMEYER: Dtsch. Apotheker-Ztg. **100**, 283, 477 (1960). — [7] ROCHELMEYER, H.: Pharmaz. Ztg. **103**, 1269 (1958). — [8] STAHL, E.: Chemiker-Ztg. **82**, 323 (1958); vgl. diese Z. **173**, 458 (1960). — [9] SVENDSEN, A. B.: Medd. norsk farmac. Selsk. **17**, 116 (1955); Pharmac. Acta Helvetiae **26**, 323 (1951).

Prof. Dr. H. ROCHELMEYER, Dr. E. MUTSCHLER, Dr. K. TEICHERT, Pharmazeutisches Institut der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, Saarstr. 21

Max Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung, München

Chromatographische Untersuchungen von Polyhydroxyphenolen, Chinonen und Hydroxychinonen an Polyamid

Von
HORST ENDRES

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 27. Oktober 1960)

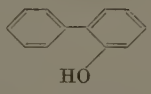
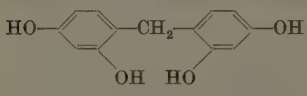
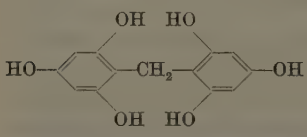
Nachdem sich Polyamidpulver für die Trennung einfacher Phenole sehr gut bewährt hatte[1,7], haben wir vor einigen Jahren die Auftrennung eines niedermolekularen Gerbstoffgemisches aus Fichtenbast, das zu etwa 90% aus Polyhydroxyphenolen besteht, beschrieben[6] und in jüngster Zeit über die Trennung des Phenolglucosidgemisches des Fichtenbastes berichtet[3]. In der Folgezeit wurde Polyamidpulver zur Isolierung von Pflanzenphenolen vielfach angewendet. HATHWAY u. SEAKINS[9] untersuchten die Phenole aus *Eucalyptus wandoo*, HAWORTH[10] die aus Sumachblättern. Von anderen Arbeitskreisen wurde die Polyamidchromatographie zur Isolierung von Flavonen[11–13], Chalkonen[12] und Farbstoffen aus Pflanzenextrakten[15] angewendet. In nahezu allen Fällen führten die Untersuchungen der nach anderen chromatographischen Methoden nur sehr schwer trennbaren Gemische, zur Isolierung kristalliner Verbindungen.

Weitere erfolgreiche Anwendungsgebiete sind die Auftrennung von DNP-Aminosäuren- und DNP-Peptidgemischen durch GRASSMANN,

HÖRMANN u. v. PORTATIUS[8], sowie STEUERLE u. HILLE[16] und die Untersuchungen an Phenolformaldehyd-Kondensationsprodukten durch REICH u. BARTHEL[14].

Die Affinität der Phenole zu Polyamid beruht auf der Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen der phenolischen Hydroxylgruppe und der Amidbindung. Die Phenole werden dabei nicht nur an der Oberfläche der einzelnen Polyamidkörner zurückgehalten, sondern können auch in das

Tabelle 1. *Steigende Affinität zum Polyamid mit Zunahme der Hydroxylgruppen*

	R_f-Werte in			
	Methanol/ Wasser 1:1	Aceton/ Wasser 1:1	Methanol	Aceton
 2-Hydroxydiphenyl	0,22	0,62	0,76	0,90
4,4′-Dihydroxydiphenyl	0,15	0,56	0,72	0,74
 2,4-2′,4′-Tetrahydroxy-diphenyl-methan	0,00	0,00	0,07	0,14
 2,4,6-2′-4′-6′-Hexahydroxydiphenyl-methan	0,00	0,00	0,05	0,10

Innere eindringen, wodurch die Kapazität der Säule wesentlich gesteigert wird und verhältnismäßig große Substanzmengen getrennt werden können.

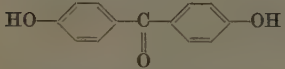
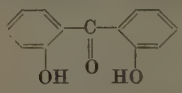
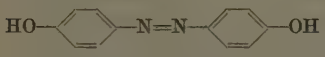
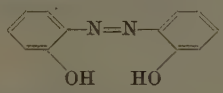
Die Elution kann mit einfachen Lösungsmitteln durchgeführt werden und steigt in ihrer Wirkung in der Reihenfolge Wasser : Methanol : Aceton : Dimethylformamid[5].

Im allgemeinen kann gesagt werden, daß die Affinität zum Polyamid erwartungsgemäß mit der Zahl der phenolischen Hydroxylgruppe zunimmt (Tab. 1)[5]. Wir haben eine größere Anzahl von Polyhydroxyphenolen untersucht[5] und können überschlagsmäßig sagen, daß z. B. in Aceton

Verbindungen mit einer Hydroxylgruppe R_f-Werte zwischen 0,9 bis 0,95, mit zwei Hydroxylgruppen zwischen 0,75 und 0,9, mit vier Hydroxylgruppen nur noch etwa 0,15 und mit sechs Hydroxylgruppen ungefähr 0,1 zeigen. Diese steigende Affinität zum Polyamid ist jedoch dann nicht zu beobachten, wenn die Hydroxylgruppen zur Ausbildung von intramolekularen Wasserstoffbrücken befähigt sind, wie dies die Dihydroxybenzophenon- und Dihydroxyazobenzolpaare der Tab. 2 zeigen.

Tabelle 2

Beeinflussung der Affinität zum Polyamid durch intramolekulare Wasserstoffbrücken

	R_f-Werte in			
	Methanol/ Wasser 1:1	Aceton/ Wasser 1:1	Methanol	Aceton
 4,4′-Dihydroxybenzophenon	0,16	0,62	0,76	0,78
 2,2′-Dihydroxybenzophenon	0,27	0,77	0,95	0,95
 4,4′-Dihydroxyazobenzol	0,18	0,51	0,72	0,78
 2,2′-Dihydroxyazobenzol	0,23	0,61	0,86	0,88

Das Auslaufchromatogramm der Abb. 1 zeigt die scharfe Trennung, die durch Chromatographie an Polyamidpulver erzielt wird.

Bei der Ausdehnung unserer chromatographischen Untersuchungen an Polyamidpulver auf Chinone zeigten diese ein eigenartiges Verhalten[2]. Gibt man Benzochinon, Naphthochinon oder Anthrachinon auf die Säule, spült mit den üblichen Lösungsmitteln nach, so ist keinerlei Affinität zum Polyamid bemerkbar. Die Chinone wandern mit der Lösungsmittelfront und können nahezu quantitativ eluiert werden. Stoppt man den Versuch jedoch nach dem Eindringen des Chinons in die Säulenfüllung ab, so tritt nach einiger Zeit eine Reaktion zwischen dem Chinon und dem Polyamid ein, die sich durch eine starke Farbvertiefung oder gar Farbveränderung bemerkbar macht, (Tab. 3). Das Chinon ist nun weder mit Methanol

oder Aceton, noch mit dem für Polyhydroxyphenole besonders wirksamen Dimethylformamid eluierbar. Das o-Naphthochinon unterscheidet sich dabei nicht wesentlich von dem p-Naphthochinon.

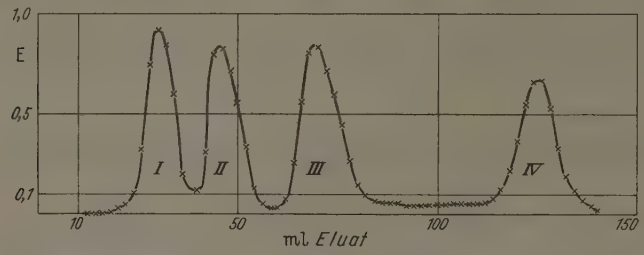


Abb. 1. Auslaufchromatogramm von *I* 2,2′-Dihydroxybenzophenon, *II* 4,4′-Dihydroxydiphenyl, *III* 4,4′-Dihydroxy-3,3′-dimethoxy-stilben und *IV* 2,4-Dihydroxybenzhydrol an einer Polyamidsäule. Lösungsmittel Aceton/Wasser 1:1

Um über die Bindungsverhältnisse zwischen Chinon und Polyamid aussagen zu können, haben wie die Konzentrationsabhängigkeit der Bindung von p-Benzochinon bestimmt.

Das Chinon wird sehr stark vom Polyamid festgehalten (Abb. 2). Mit steigender Konzentration erreicht die Sorptionsisotherme einen Sättigungswert, der einer Beladung von 11,5—12,0 μMol Chinon/g Polyamid

Tabelle 3. *Farbveränderung verschiedener Chinone an Polyamid*

Substanz	Farbe ursprünglich in Methanol	Farbe an Polyamid
1,4-Benzochinon	hellgelb	rosa
1,4-Naphthochinon	hellgelb	tief gelb
1,2-Naphthochinon	rotbraun	ocker
2-Hydroxy-1,4-naphthochinon	hellgelb	orange
2-Hydroxy-3-vinylphenyl-1,4-naphthochinon	hellrot	violett

entspricht. Die freien Aminogruppen, des von uns verwendeten Polyamids betragen nach GRASSMANN u. Mitarb.[8] 24,6 μMol; es werden also von zwei Aminogruppen ein Chinon gebunden.

Die Erklärung, daß die irreversible Bindung der Chinone am Polyamid auf einer 1,4-Addition der freien Aminogruppen beruht, liegt auf der Hand. Wir haben zur Bestätigung dieser Befunde die Konzentrationsabhängigkeit der Bindung von p-Benzochinon an Polyamid, dessen freie Aminogruppen acetyliert waren, untersucht. Zu diesem acetylierten Polyamid zeigt das Chinon nahezu keine Affinität (Abb. 2).

In säulenchromatographischen Versuchen an acetyliertem Polyamid zeigen, wie nun nicht anders zu erwarten war, p-Benzochinon und 1,4-

Naphthochinon keinerlei Affinität mehr und werden nahezu mit der Lösungsmittelfront eluiert (Tab. 4). Gleiches kann vom 1,2-Naphthochinon gesagt werden und dürfte wohl auf alle Chinone, die keine zu

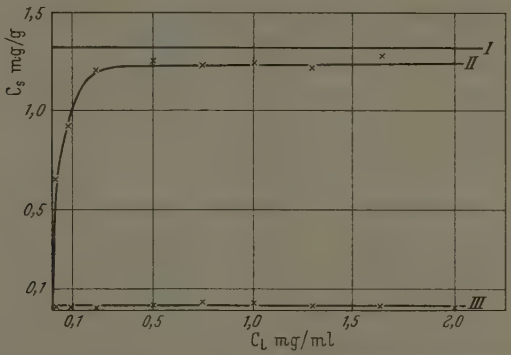


Abb. 2. Sorptionsisothermen von p-Benzochinon an Polyamid und acetyliertem Polyamid. C_L Konzentration von p-Benzochinon in Lösung; C_S Konzentration von p-Benzochinon in der festen Phase. *I* Theoretische Aufnahme von 1 Mol Chinon je 2 Mol Aminogruppen: *II* Gefundene Sorptionsisotherme an Polyamid; *III* an acetyliertem Polyamid

Wasserstoffbrückenbindung befähigte funktionelle Gruppe enthalten, übertragbar sein.

Die in der Tabelle weiter aufgeführten Hydroxynaphthochinone dagegen zeigen R_f-Werte, die in der gleichen Größenordnung liegen, wie

Tabelle 4. *R_f-Werte verschiedener Chinone, Hydrochinone und Polyhydroxyphenole an acetyliertem Polyamid*

	Methanol/ Wasser 1:1	Methanol	Aceton
1,4-Benzochinon	0,91	0,92	1,00
1,4-Naphthochinon	0,83	0,90	0,95
1,2-Naphthochinon	0,86	0,91	0,95
5,8-Dihydro-naphthochinon (1,4)	0,90	0,93	1,00
2-Hydroxy-5,6,7,8-tetrahydronaphthochinon (1,4)	0,43	0,88	0,90
2-Hydroxy-naphthochinon	0,35	0,84	0,88
2-Hydroxy-3-vinylphenyl-naphthochinon (1,4)	0,10	0,33	0,39
2,2′-Dihydroxy-benzophenon	0,29	0,93	0,93
2,2′-Dihydroxyazobenzol	0,26	0,89	0,90

Phenole, bei denen die Hydroxylgruppe durch intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung blockiert ist, wie dies der Vergleich von 2-Hydroxy-1,4-Naphthochinon mit dem 2,2′-Dihydroxy-benzophenon und dem 2,2′-Dihydroxyazo-benzol zeigt (Tab. 4).

Polyhydroxyphenole verhalten sich an freiem und acetyliertem Polyamid vollkommen gleich (vgl. dazu auch GRASSMANN u. Mitarb.[8]). In Tab. 5 sind die R_f-Werte einiger Phenole an acetyliertem und nicht

Tabelle 5. *R_f-Werte verschiedener Polyhydroxyphenole an a) acetyliertem Polyamidpulver und b) unbehandeltem Polyamidpulver*

Substanz	Methanol/ Wasser 1:1		Aceton/ Wasser 1:1		Methanol		Aceton	
	a	b	a	b	a	b	a	b
4-Hydroxydiphenyl	0,21	0,20	0,65	0,62	0,78	0,77	0,87	0,88
β-Naphthol	0,28	0,26	0,71	0,70	0,95	0,95	1,00	1,00
2,4-Dihydroxy-benzophenon	0,22	0,20	0,67	0,65	0,76	0,75	0,85	0,84
2,4-Dihydroxy-diphenylmethan	0,13	0,15	0,21	0,22	0,41	0,40	0,60	0,66
4,4′-Dihydroxy-diphenylsulfon	0,20	0,21	0,55	0,53	0,70	0,72	0,77	0,76
4,4′-Dihydroxy-stilben	0,19	0,20	0,65	0,63	0,74	0,73	0,74	0,77

acetyliertem Polyamidpulver zusammengestellt. Die Chinone lassen sich an acetyliertem Polyamid ausgezeichnet von den Polyhydroxyphenolen im präparativen Maßstab trennen. Die Abb. 3 zeigt das Auslaufchromatogramm eines Gemisches aus Chinon, Hydroxychinon und Polyhydroxyphenolen.

Bei den Substanzen, die bisher auf ihre Affinität zum Polyamidpulver untersucht wurden, können wir zwei Klassen unterscheiden. Die eine

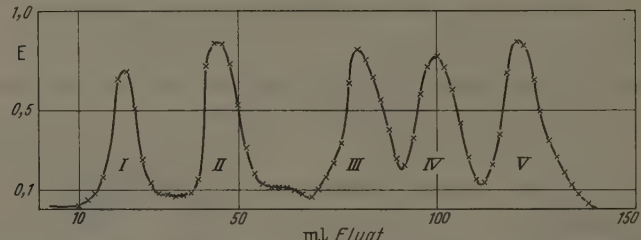


Abb. 3. Auslaufchromatogramm von *I* p-Benzochinon; *II* 2-Hydroxy-5,6,7,8-tetrahydro-naphthochinon (1,4); *III* 2,2′-Dihydroxy-azobenzol; *IV* 2,4′-Dihydroxy-benzophenon; *V* 2,2′-Dihydroxy-5,5′-dimethyl-diphenylmethan an einer acetylierten Polyamidsäule. Lösungsmittel = Methanol/Wasser 1:1

Stoffklasse wird durch Wasserstoffbrücken zur Amidgruppe zurückgehalten; hierher gehören die Phenole, bei der anderen Stoffklasse wird die Affinität durch die freien Aminogruppen des Polyamids bewirkt, hierher gehören die aromatischen Nitroverbindungen und die Chinone. Während die Affinität der Nitroverbindungen, die nach GRASSMANN u. Mitarb.[8] durch Elektronen-Donator-Acceptor-Wirkung hervorgerufen wird, reversibel ist, ist die der Chinone irreversibel und beruht auf einer 1,4-Addition der Aminogruppen.

Beschreibung der Versuche

Als Polyamidpulver wurde Polycaprolactam der Marke Ultramid BM 228, monomerenarm, Siebgröße 0,02 mm, der Firma Badische Anilin- und Sodafabrik, Ludwigshafen, verwendet.

Die Füllung der Säulen erfolgte in bereits mehrfach beschriebener Weise[6,7]. Ebenso die Bestimmung des Retentionsvolumens[6,7] und die Acetylierung[8].

Durchführung der chromatographischen Untersuchungen

Von den untersuchten Substanzen wurden jeweils etwa 0,5 mg in 1 ml des anschließend zur Elution verwendeten Lösungsmittels gelöst und auf eine Säule mit 8 mm ⌀ und etwa 25 cm Füllhöhe aufgetragen. In den Fällen, wo die Substanzen mit Wassergemischen keine klare Lösung ergaben, wurde im reinen organischen Lösungsmittel gelöst.

Anschließend wurde mit den entsprechenden Lösungsmitteln eluiert. Das Eluat wurde im Fraktionsteiler in Fraktionen zu 2 ml aufgefangen und bei den Polyhydroxyphenolen, die einzelnen Fraktionen mit dem abgeänderten Reagens nach Folin u. Denis[4] (vgl. Grassmann u. Mitarb.[5]) gestestet.

Die Chinone und Hydroxychinone wurden mit dem Colorimeter Medeor bei 366 nm gemessen.

Die Aufnahme der Sorptionsthermen wurde, wie von Grassmann u. Mitarb.[8] für DNP-Glycin beschrieben, durchgeführt.

Frau C. Fischer sei auch an dieser Stelle für experimentelle Mithilfe gedankt.

Literatur

[1] Carelli, V., A. M. Liquori u. A. Mele: Nature (London) **176**, 70 (1955). — [2] Endres, H., W. Grassmann u. M. Oppelt: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **317**, 21 (1959). — [3] Endres, H., u. K. Merkle: Chem. Ber., **94**, 431 (1961). — [4] Folin, O., u. W. Denis: J. biol. Chemistry **22**, 305 (1915). — [5] Grassmann, W., H. Endres, M. Oppelt u. H. El Sissi: Leder **10**, 149 (1959). — [6] Grassmann, W., H. Endres, W. Pauckner u. H. Mathes: Chem. Ber. **90**, 1125 (1957); vgl. diese Z. **161**, 77 (1958). — Endres, H.: Leder 8, 222 (1957). — Grassmann, W.: Leder **9**, 193 (1958). — Grassmann, W., H. Endres u. W. Pauckner: Chem. Ber. **91**, 134 (1958). — Endres, H., u. F. Leppmeier: Chem. Ber., **94**, 419 (1961). — [7] Grassmann, W., H. Hörmann u. A. Hartl: Makromolekulare Chem. **21**, 37 (1956); vgl. diese Z. **156**, 315 (1957). — [8] Grassmann, W., H. Hörmann u. H. v. Portatius: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. im Druck. — Hörmann, H., u. H. v. Portatius: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **315**, 141 (1959); vgl. diese Z. **175**, 225 (1960). — [9] Hathway, D. E., u. I. W. T. Seakins: Biochemic. J. **72**, 369 (1959). — [10] Haworth, R. D.: Sympos. of Plant Phenolic Group, 21. 4. 60, Egham, Surrey. — [11] Hörhammer, L., H. Wagner u. W. Leeb: Naturwissenschaften **44**, 513 (1957); vgl. diese Z. **162**, 150 (1958). — Hörhammer, L., H. Wagner u. H. Grasmeier: Naturwissenschaften **45**, 388 (1959). — Hörhammer, L., H. Wagner, J. Izquierdo u. H. Endres: Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. **291/63**, 269 (1958); vgl. diese Z. **166**, 397 (1959). — [12] Neu, R.: Nature (London) **182**, 660 (1958). — [13] Oppelt, M.: Diss., Univ. München, 1958. — [14] Reich, G., u. W. Barthel: Gesammelte Abh. dtsch. Lederinst. Freiberg/Sa., Heft **14**, 27 (1959). — [15] Schmidt, O. T., u. W. Schönleben: Z. Naturforsch. **126**, 262 (1957). — Schmidt, O. T., P. Becker u. M. Hübner: Chem. Ber. **93**, 1296 (1960). — [16] Steuerle, H., u. E. Hille: Biochem. Z. **331**, 220 (1959). — Zahn, H., u. E. Hille: Z. Naturforsch. **136**, 824 (1958).

Dr. H. Endres,
München 15, Max Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung, Schillerstraße 46

Institut für Chemische Technologie der Technischen Hochschule Darmstadt

Eine Methode zur quantitativen papierchromatographischen Bestimmung von Zuckern und Zuckeralkoholen

Von

K. Schoenemann, G. Jeschek und K. Frommhold

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 27. Oktober 1960)

Im Rahmen der Untersuchungen zum weiteren Ausbau und zur wirtschaftlichen Verbesserung des Rheinau-Verfahrens zur Hydrolyse des Holzes[9,10] gelang es, eine spezielle quantitative Analysenmethode auszuarbeiten, die einerseits zum Studium des Reaktionsablaufs bei der Hydrolyse und andererseits für reaktionskinetische Messungen bei der katalytischen Hydrierung von Holzzuckerlösungen geeignet ist.

Analytische Aufgabe

Eine bei der technischen Hydrolyse des Holzes anfallende Zuckerlösung enthält beispielsweise neben polymeren Zuckern Galaktose, Glucose, Mannose, Arabinose und Xylose. Wird eine derartige Lösung partiell hydriert, so kommen Dulcit, Sorbit, Mannit, Arabit und Xylit hinzu. Unter bestimmten Reaktionsbedingungen kann sich außerdem noch Fructose bilden.

Dem Analytiker werden also zwei Aufgaben gestellt. Die einfachere ist die Untersuchung der Holzhydrolysate, die nur etwa 6—8 Zucker enthalten. Die weitaus schwierigere ist dagegen die Analyse von Proben, die während der Hydrierung gezogen werden; denn diese enthalten Zucker und Zuckeralkohole in wechselnden Mengen nebeneinander, d. h. etwa 10—14 Substanzen. Die quantitative Analyse derartiger Gemische aus chemisch und physikalisch sehr ähnlichen Substanzen bereitet naturgemäß große Schwierigkeiten.

Lösung mit Hilfe der absteigenden Papierchromatographie

Zur Lösung des analytischen Problems erwies sich die absteigende Papierchromatographie auf reinen nicht imprägnierten Linters-Papieren am aussichtsreichsten. Sie konnte zu einer Analysenmethode ausgearbeitet werden, die sich wahrscheinlich auch auf andere Stoffgruppen entsprechend übertragen läßt[3,7]. Sie erscheint besonders dann geeignet, wenn Gemische aus zahlreichen Substanzen mit chemisch und physikalisch sehr ähnlichen Eigenschaften quantitativ analysiert werden sollen.

Entwicklungsreagentien

Die erwähnten Zucker lassen sich auf dem Papierchromatogramm beispielsweise nach FISCHER u. DÖRFEL[2] mit einer alkalischen Lösung von Triphenyltetrazoliumchlorid sicher und zuverlässig als blutrote Flecke sichtbar machen, ohne daß dabei gleichzeitig anwesende Zuckeralkohole stören würden: denn nur die Zucker reduzieren das Reagens zu dem roten Triphenylformazan. Diese Methode wird zum Beispiel zur Bestimmung von Glucose neben Dulcit auf einem vereinfachten Chromatogramm angewandt, wie später noch näher erläutert wird.

Für die Zuckeralkohole fand sich dagegen kein ähnlich spezifisches Reagens, das für quantitative Analysen gleich gut geeignet wäre.

Damit ist die Möglichkeit verschlossen, Zucker und Zuckeralkohole auch nach unvollständiger Trennung auf zwei verschiedenen Papierchromatogrammen mit spezifischen Reagentien zu entwickeln und quantitativ zu bestimmen. Deshalb erhebt sich die Forderung, das komplexe Gemisch so weit aufzutrennen, daß sich alle Substanzen auf dem Chromatogramm eindeutig voneinander unterscheiden lassen, wenn sie einzeln quantitativ bestimmt werden sollen. Erst dann läßt sich das Silberreagens nach DEDONDER[8] erfolgreich anwenden, mit dem sich Zucker und Zuckeralkohole nebeneinander zuverlässig entwickeln lassen, wenn standardisierte Bedingungen genau genug eingehalten werden.

Dieses Silberreagens stellt man am einfachsten her, indem man 4 ml einer gesättigten wäßrigen Silbernitratlösung in eine Mischung aus 80 ml Aceton und 5 ml dest. Wasser eingießt. Falls dabei noch ein mikrokristalliner Niederschlag von Silbernitrat entsteht, kann man ihn durch Zusatz weniger Tropfen Wasser wieder in Lösung bringen. Diese Lösung ist bei Ausschluß von Licht wochenlang haltbar.

Um eine gleichmäßige Entwicklung zu erreichen, ist besonders darauf zu achten, daß das Papierchromatogramm mit mäßiger und gleichförmiger Geschwindigkeit durch die Reagenslösung gezogen wird. Schon bei kurzen Stockungen steigt die Lösung im Papier hoch, wobei das Silbersalz hinter der Lösungsmittelfront zurückbleibt. Eine solche Front zeichnet sich nach der Entwicklung als heller Streifen ab, der bei der späteren photometrischen Auswertung stört. Dieser Fehler läßt sich jedoch nach einiger Übung vermeiden.

Nach dem Verdunsten des Lösungsmittels in freier Luft hängt man das Chromatogramm $^1/_2$ Std bei Zimmertemperatur in eine mit Wasserdampf und Ammoniak gesättigte Kammer. Nach kurzer Zeit entwickeln die Aldosen schwach braune Flecke. Beim anschließenden Erhitzen im Wärmeschrank auf gleichmäßig 85° C reduzieren auch die Zuckeralkohole das Silbersalz innerhalb von 6—10 min, wobei sich dunkelbraune Flecke auf nur schwach hellbraun verfärbtem Papieruntergrund bilden. Das überschüssige Silbersalz wird mit einer 10%igen Natriumthiosulfatlösung herausgelöst, die etwa 5% Natriumacetat enthält und mit Essigsäure

auf p_H 6 eingestellt ist. Das Fixierbad muß immer gut sauer gehalten werden, da sich sonst auf dem Chromatogramm störende unregelmäßige schwarze Flecke, wahrscheinlich von Silberoxyd, bilden.

Photometrische Bestimmung des Silbers auf dem Streifenchromatogramm

Da diese einzelnen Silberflecke nur etwa 10—40 μg Silber enthalten, kommt praktisch nur eine direkte photometrische Bestimmung auf dem Papier in Frage, ähnlich wie Grassmann u. Hannig[4] elektrophoretisch getrennte Eiweißbanden auswerteten.

Nach diesen beiden Autoren ist die photometrische Bestimmung auf dem Papier nicht ungenauer als colorimetrische Methoden, bei denen der Farbstoff in einer geeigneten Lösung photometrisch erfaßt wird. Die erreichbare Genauigkeit mit Hilfe des Zusatzgerätes zum Photometer „Eppendorf" beträgt z.B. bei einer quantitativen Auswertung elektrophoretisch getrennter Eiweißbanden $\pm$ 1,1%.

Das Lambert-Beersche Gesetz

$$E = \log \frac{I_0}{I} = k \cdot c \cdot d \; * \qquad (1)$$

gilt auch bei der Bestimmung des Farbstoffes auf dem Linters-Papier, das durch ein geeignetes Mittel transparent gemacht wird. Dafür läßt sich die Gl. (1) in die folgende Form bringen:

$$E = \log \frac{I_0}{I} = k \cdot \frac{a}{f} \; * \qquad (2)$$

Der Quotient a/f, die Farbstoffmenge pro Flächeneinheit (Farbstoffdichte), steht in Gl. (2) an Stelle des Produkts aus Farbstoffkonzentration c und Dicke d der durchstrahlten Flüssigkeitsschicht. Demnach besteht zwischen der Farbstoffdichte auf dem Papier und der Extinktion E eine lineare Beziehung.

Diese Methode läßt sich auch bei der vorliegenden analytischen Aufgabe anwenden, da durch eine besondere Ausführungsform der Papierchromatogramme die Substanzflecke in der für die Messung erforderlichen Bandenform erzielt werden können.

Die von uns benutzten Chromatogramme (Abb. 1) bestehen aus je 6 38 mm breiten Streifen, die nur oben an dem Teil zusammenhängen, der in den Fließmitteltrog eingelegt wird und für eine gleichmäßige Verteilung des Laufmittels sorgt.

Die Bandenform der Substanzflecke erreicht man einfach dadurch, daß die zu analysierende Substanzlösung mit Hilfe einer Mikrometerspritze gleichmäßig auf den Startlinien über die ganze Breite der einzelnen

* a = Farbstoffmenge; c = Farbstoffkonzentration; d = durchstrahlte Schichtdicke; E = Extinktion; f, F = Fläche; I_0 = eingestrahlte Lichtintensität; I = durchtretende Lichtintensität; k = Extinktionskoeffizient.

Streifen des Chromatogramms aufgetragen wird. Die Substanzen werden dann vom Fließmittel in der schon durch diese Art des Auftragens der Analysenlösung vorgegebenen Bandenform weiter transportiert. Die Banden verbreitern sich allerdings durch Diffusion, und zwar um so mehr, je länger und weiter sie laufen.

Die geläufigen ovalen Substanzflecke, die man stets bei punktförmigem Auftragen des Analysengemisches erhält, sind für die photometrische Auswertung nicht geeignet, weil sie zwangsläufig zu niedrige Extinktionswerte ergeben, wie sich mathematisch beweisen läßt.

Die Silberbildung durch Reduktion des Reagenses in den Zuckerbanden verläuft nicht vollständig nach den stöchiometrischen Reaktionsgleichungen, sondern hängt sehr stark von den gewählten Bedingungen

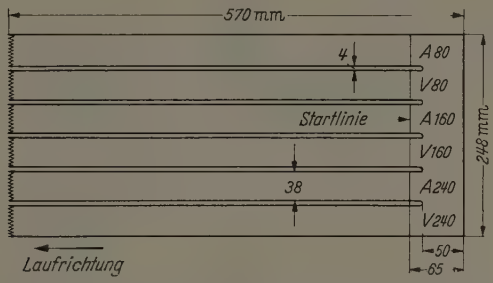


Abb. 1. Streifenchromatogramm (*A* Analysengemisch; *V* Vergleichsgemisch)

bei der Entwicklung ab. Es ist aber sehr schwierig, oder mit erträglichem Aufwand wahrscheinlich kaum möglich, die standardisierten Entwicklungsbedingungen so weit einzuhalten, daß eine Eichkurve genau genug reproduziert wird. Daher empfiehlt es sich, auf dem gleichen Chromatogramm stets ein bekanntes Vergleichsgemisch mitlaufen zu lassen, das in seiner quantitativen Zusammensetzung dem zu analysierenden Gemisch möglichst nahekommt.

Wenn man die Extinktionen der einzelnen Zuckerbanden nur innerhalb desselben Chromatogramms miteinander vergleicht, wird das Analysenergebnis von irgendwelchen Unregelmäßigkeiten bei der Entwicklung weitgehend unabhängig, und wesentliche Fehlerquellen werden damit ausgeschieden.

Am zweckmäßigsten werden daher Analysen- und Vergleichslösungen abwechselnd auf den 6 Streifen des Chromatogramms in steigenden Mengen aufgetragen (z. B. 10, 15 und 20 μl Lösung), damit später bei der Auswertung der Fehler ausgeglichen werden kann, der beim Auftragen der kleinen Lösungsmengen entsteht. Dieser Dosierfehler kann je nach Arbeitsweise 1—2% betragen.

Zur photometrischen Auswertung der einzelnen, vorher transparent gemachten Streifen, eignen sich alle halb- und vollautomatischen Geräte, die zur Ausmessung von Elektropherogrammen benutzt werden — Geräte, die eine Aufzeichnung der Extinktion in Abhängigkeit von der Streifenlänge gestatten.

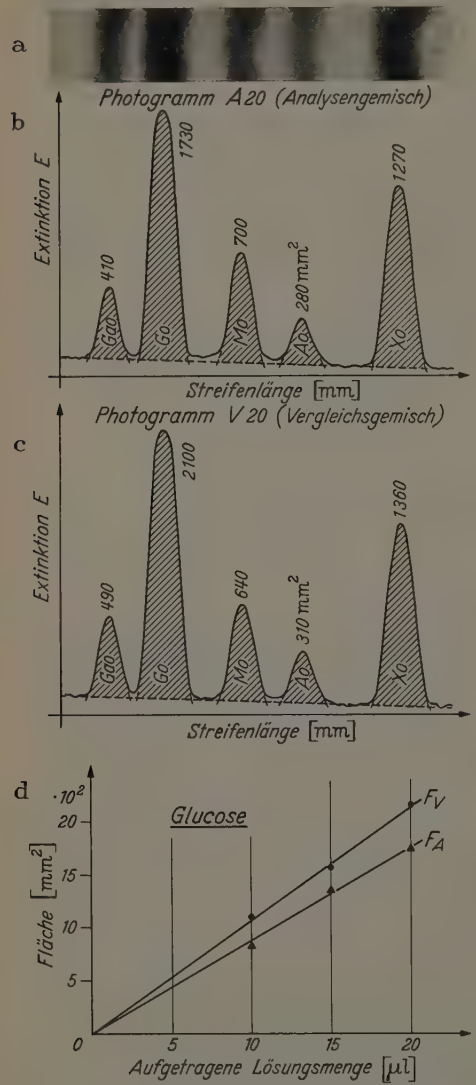


Abb. 2 a—d. Photometrische Auswertung eines Streifenchromatogramms (Abkürzungen siehe Tab. 1)

Abb. 2 veranschaulicht den Gang der photometrischen Auswertung eines Streifenchromatogramms zur Analyse eines Vorzukkergemisches. Unter der Photographie eines Chromatogrammstreifens (a) sind die den schwarzen Silberbanden entsprechenden Photogrammkurven für Analysen- (b) und Vergleichsgemisch (c) schematisch dargestellt.

Nachdem in den Photogrammen der 6 einzelnen Streifen für die zunehmenden Mengen des Analysen- und des bekannten Vergleichsgemisches die Grundlinie für die Untergrundfärbung des Papiers festgelegt ist und die symmetrischen Kurvenabschnitte unter den einzelnen Maxima bis auf diese Grundlinie verlängert sind, werden die auf diese Weise abgegrenzten Flächen planimetriert.

Die schraffierten Flächen stellen ein Maß dar für die Zuckermenge je Bande. Es wurde gefunden, daß zwischen der Größe

dieser Flächen und der zugrunde liegenden Substanzmenge eine strenge Linearität nur bis etwa 40 μg der einzelnen zu bestimmenden Zucker oder Zuckeralkohole besteht. Die aufzutragenden Mengen des Analysengemisches sind daher so zu bemessen, daß 40 μg pro Bande nach Möglichkeit nicht überschritten werden.

Die planimetrisch aus allen 6 Streifen ermittelten Maßzahlen der einzelnen Flächen F_A für das Analysengemisch und F_V für das Vergleichsgemisch werden für jede Substanz in ein weiteres Koordinatensystem übertragen, wie es für Glucose in Abb. 2d gezeichnet ist. Hier erreicht man, wie schon angedeutet, einen Ausgleich des Dosierfehlers, der beim Auftragen der Lösungen auf die einzelnen Chromatogrammstreifen entsteht, dadurch, daß man Ausgleichsgerade für Analysen- und Vergleichsgemisch durch die jeweiligen Punktpaare legt. Die Schnittpunkte der beiden Ausgleichsgeraden mit einer der Ordinatenparallelen geben die korrigierten Maßzahlen der Flächen an, die zur Berechnung des Analysenergebnisses in die folgende Gleichung (3a) eingesetzt werden, die sich durch Umformung der Gl. (3) ergibt.

$$\frac{F_{Go\,\text{Anal.}}}{F_{Go\,\text{Vergl.}}} = \frac{m_{Go\,\text{Anal.}}}{m_{Go\,\text{Vergl.}}} = \frac{c_{Go\,\text{Anal.}}}{c_{Go\,\text{Vergl}}} \tag{3}$$

$$c_{Go\,\text{Anal.}} = \frac{F_{Go\,\text{Anal.}}}{F_{Go\,\text{Vergl.}}} \cdot c_{Go\,\text{Vergl.}} \cdot \tag{3a}$$

Jayme u. Knolle[5] wenden bei ihrer Methode zur quantitativen papierchromatographischen Bestimmung von Zuckern andere Entwicklungsreagentien an und verzichten, im Gegensatz zu der hier dargelegten Arbeitsweise darauf, Vergleichsgemische auf denselben Chromatogrammen mitlaufen zu lassen. Sie greifen statt dessen bei der Auswertung auf Eichkurven zurück. Damit vermindern sie zwar den Arbeitsaufwand bei Vorbereitung und Auswertung der Chromatogramme für eine Analyse, aber der Aufwand für die notwendige exakte Einhaltung der Entwicklungsbedingungen wird entsprechend größer. Ihre Methode scheint sich daher hauptsächlich für laufende Serienanalysen in der Betriebskontrolle bei der Zellstoffabrikation zu eignen. Die hier vorliegende Methode läßt sich dagegen leichter auf komplizierte Gemische aus zahlreichen Substanzen und quantitativ stark wechselnder Zusammensetzung abstimmen.

Systematische Ermittlung des optimalen Fließmittels

Die wesentliche Voraussetzung für die quantitative Analyse eines Zucker- und Zuckeralkoholgemisches ist natürlich ein Fließmittelgemisch, das die Substanzbanden auf dem Chromatogramm so weit auftrennt, daß die Maxima im Extinktionsdiagramm deutlich unterschieden werden.

Die Methode von Durso u. Müller[1] zur Beurteilung der Trenneigenschaften von Fließmittelsystemen konnte zu einer systematischen Methode weiter entwickelt werden, die es gestattet, innerhalb eines Fließmittelsystems, das für die jeweilige Zusammensetzung des Analysengemisches optimale Laufmittel zu finden[3].

Während jedoch die Methode von Durso u. Müller auf Gemische von wenigen Substanzen beschränkt ist, weil sie mit steigender Anzahl der Einzelsubstanzen im Gesamtgemisch immer unübersichtlicher wird, eignet sich die vorliegende Auswahlmethode besonders für Gemische aus zahlreichen Substanzen.

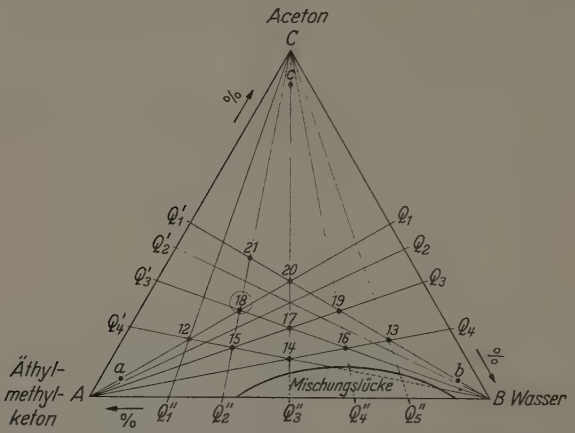


Abb. 3. Die Fließmittelzusammensetzung im Gibbsschen Phasendreieck

Die meisten in der Papierchromatographie angewandten Fließmittel sind Dreistoffsysteme, die sich im allgemein bekannten Gibbsschen Phasendreieck darstellen lassen (Abb. 3).

Auf den Linien AQ liegen alle Fließmittel mit konstantem Molverhältnis $B:C$, bei wechselndem prozentualen Anteil A. Entsprechendes gilt für die Linien BQ' und CQ''. Die Schnittpunkte der Geraden AQ, BQ' und CQ'' ergeben die Zusammensetzungen der Fließmittel, die hier durch die arabischen Zahlen gekennzeichnet sind. Mit diesen Laufmitteln wird die Auftrennung des Gesamtgemisches experimentell untersucht. Durch Anwendung von Fließmitteln mit einem sehr hohen Anteil von jeweils 90 Mol-% A, B oder C und einem Molverhältnis der beiden anderen Komponenten von 1 (gekennzeichnet durch die kleinen Buchstaben a, b und c) wird außerdem festgestellt, welchen Einfluß die einzelnen Komponenten des Fließmittelsystems auf die Auftrennung des Gesamtgemisches haben.

Zur Kennzeichnung der Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Substanzen werden an Stelle der üblichen R_f-Werte die sogenannten R_{Go}-Werte* benutzt, welche die gegenseitige Lage der Substanzen auf dem Chromatogramm, bezogen auf Glucose, direkt ausdrücken.

Diese R_{Go}-Werte der einzelnen Substanzen, die mit den verschiedenen im Gibbsschen Phasendreieck definierten Fließmitteln erzielt werden, trägt man in Koordinatensysteme ein, wie sie in Abb. 4 dargestellt sind. Auf der Abszisse wird zweckmäßigerweise die Komponente aufgetragen, welche die Trennung des betrachteten Substanzgemisches am stärksten beeinflußt. Im vorliegenden Fall ist es das Äthylmethylketon. Die Anteile der

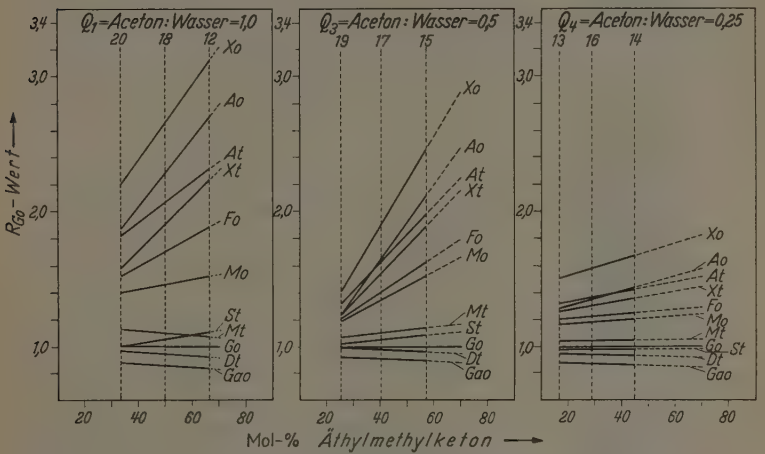


Abb. 4. Graphische Darstellungen der R_{Go}-Werte für das Fließmittelsystem Äthylmethylketon-Aceton-Wasser (Abkürzungen siehe Tab. 1)

beiden anderen Komponenten Aceton und Wasser bilden darin die Quotienten Q, die jeweils am Kopf der 3 Schaubilder angegeben sind.

Auf diese Weise erhält man ein System mehr oder weniger stark divergierender Geraden. Bei anderen Fließmittelsystemen können auch schwach gekrümmte Kurven auftreten. Je größer der Abstand der Schnittpunkte zweier benachbarter Kurven mit den einzelnen Ordinatenparallelen für die verschiedenen Laufmittel wird, um so besser sind im allgemeinen auch die Zentren der entsprechenden Banden auf dem Chromatogramm voneinander getrennt. Man kann also aus diesem Schaubild mit einem Blick den Trenneffekt jedes einzelnen Fließmittels

* $R_{Go} = \frac{\text{Strecke: Startpunkt — Substanzfleck}}{\text{Strecke: Startpunkt — Glucosefleck}}$.

ablesen und das Laufmittel aussuchen, das für eine gewünschte Trennung am besten geeignet erscheint.

Die drei Abbildungen für das Fließmittelsystem Äthylmethylketon-Aceton-Wasser zeigen deutlich, daß mit abnehmendem Quotienten Q = Aceton : Wasser, also mit zunehmendem Wassergehalt, die Trennung des Substanzgemisches immer schlechter wird. Gleichzeitig geht daraus hervor, daß bei konstantem Quotienten die Trennung mit steigendem Anteil an Äthylmethylketon verbessert wird.

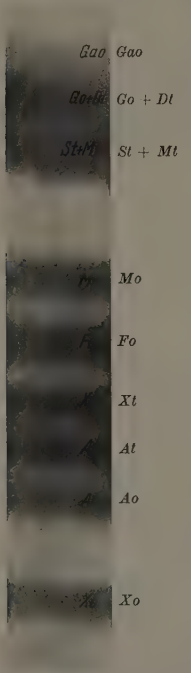


Abb. 5. Trennung eines Zucker-Zuckeralkoholgemisches mit Fließmittel Nr. 18 (Abkürzungen siehe Tab. 1)

Mit dem Fließmittel Nr. 18 (Tab. 1) lassen sich für die beschriebenen Analysengemische auf reinem Linters-Papier die besten Trennergebnisse erzielen, wie man aus dem Kurvenverlauf, besonders für die Substanzgruppe Fructose-Xylit-Arabit und Arabinose, erkennen kann. Dieses Laufmittel Nr. 18 wurde in der Darstellung des Gibbsschen Phasendreiecks (Abb. 3) durch einen Kreis besonders gekennzeichnet.

Die Trennung des Gesamtgemisches läßt sich teilweise noch verbessern mit Hilfe der von Jeanes, Wise u. Dimler[6] beschriebenen Methode der Mehrfachentwicklung, die auch in Deutschland unter der englischen Bezeichnung „Multiple Development" bekannt wurde.

Abb. 5 zeigt als Beispiel für die Auftrennung des Gesamtgemisches die Photographie eines entwickelten Chromatogrammstreifens, der nach dieser Methode mit Fließmittel Nr. 18 nach viermaligem Durchgang und Zwischentrocknung mit einer Gesamtlaufzeit von 51 Std erhalten wurde. Diese Aufnahme zeigt deutlich, daß sich nur noch die Banden von Glucose und Dulcit einerseits und Sorbit und Mannit andererseits überschneiden.

Es erscheint demnach nicht möglich, das vorliegende Substanzgemisch mit einem einzigen Fließmittel aus dem System Äthylmethylketon-Aceton-Wasser vollständig zu trennen. Eine eingehende Untersuchung anderer Fließmittelsysteme mit dem Ziel, ein Laufmittel zu finden, mit dem eine vollständige Trennung gelingt, würde allerdings einen zusätzlichen großen Arbeitsaufwand bedeuten. Außerdem ist es durchaus ungewiß, ob man dabei das gesuchte Fließmittel wirklich auffinden kann. Deshalb erscheint es sinnvoll, sich mit dem Ergebnis zu

begnügen, daß eine vollständige Analyse der Zucker- und Zuckeralkoholgemische nur mit mehreren Chromatogrammen gelingt, die mit verschiedenen bereits bekannten Fließmitteln erhalten werden.

In Tab. 1 wird die Zusammensetzung und das Trennvermögen der angewandten Fließmittel dargestellt.

Quantitative Analyse der Zucker-Zuckeralkoholgemische

Da es vielfach ausreicht, den Gehalt an Mannit und Sorbit als Summe zu kennen, braucht man nur die Glucose auf einem vereinfachten Chromatogramm nach der Methode von FISCHER u. DÖRFEL[2] zu bestimmen. Diese Möglichkeit wurde schon bei der Behandlung der Entwicklungsreagentien erwähnt. Die Analysendaten der übrigen Substanzen erhält man aus einem Streifenchromatogramm, das mit dem Fließmittel Nr. 18 entwickelt wird. In diesem Fall kommt man also mit zwei Chromatogrammen aus.

Tabelle 1. *Zusammensetzung und Trennvermögen der angewandten Fließmittel*

Fließmittel Zusammensetzung in Volumenteilen	Quantitativ bestimmbares Gemisch								
Nr. 18: Äthylmethylketon-Aceton-Wasser = 9,45 : 3,88 : 1	*Gao*	*Go* oder *Dt*	*Mt* oder *St*	*Mo*	*Fo*	*Xt*	*At*	*Ao*	*Xo*
Nr. 40: Äthylacetat-Pyridin-Wasser = 18,8 : 4,5 : 1	*Gao* oder *Dt*	*Go* oder *St* oder *Mt*		*Mo* oder *Xt*		*At* oder *Fo*		*Ao*	*Xo*
Nr. 30: Äthylacetat-Pyridin-Wasser = 6,67 : 1,83 : 1	*Gao*	*Dt* oder *St*	*Go* oder *Mt*	*Mo* oder *Xt* oder *Fo*			*At*	*Ao*	*Xo*

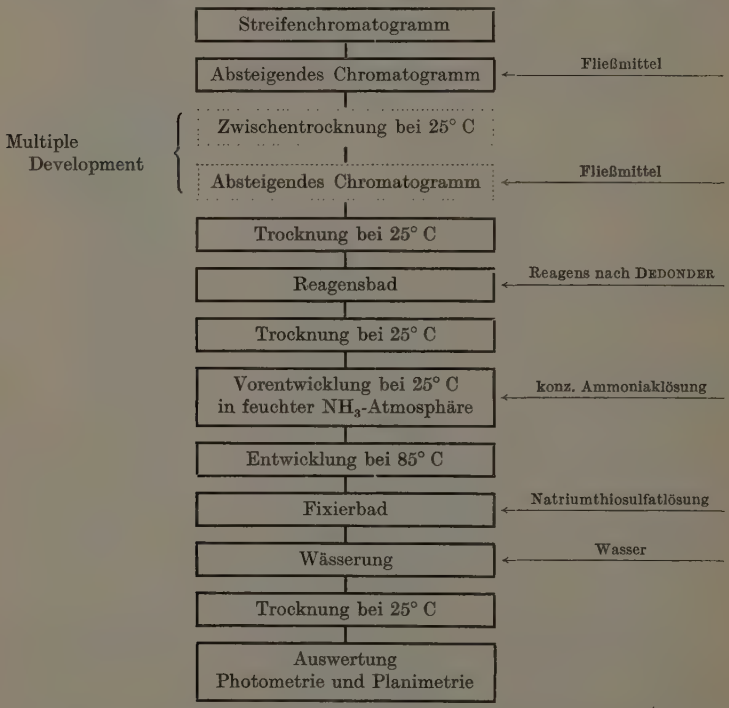
Abkürzungen: *Ao* = Arabinose; *At* = Arabit; *Dt* = Dulcit; *Fo* = Fructose; *Gao* = Galaktose; *Go* = Glucose; *Mo* = Mannose; *Mt* = Mannit; *Xo* = Xylose; *Xt* = Xylit.

Wenn dagegen die Analysendaten für Mannit und Sorbit getrennt verlangt werden, sind drei verschiedene Streifenchromatogramme notwendig, die mit den Fließmitteln Nr. 18, 30 und 40 (Tab. 1) entwickelt und anschließend photometrisch ausgewertet werden. Auf diese Weise können Galaktose, Mannose, Fructose, Xylit, Arabit, Arabinose und Xylose direkt bestimmt werden, während die Analysendaten für die übrigen Substanzen des Gemisches durch Differenzbildung erhalten werden.

Über die erreichbare Genauigkeit für die einzelnen Bestandteile des komplexen Gesamtgemisches lassen sich insofern keine endgültigen Aussagen machen, als noch weitere systematische Untersuchungen über den Einfluß unterschiedlicher Mengenverhältnisse der zu bestimmenden Substanzen angestellt werden müßten. Solche Untersuchungen dürften allerdings die vorliegenden Ergebnisse kaum wesentlich verändern. Die Genauigkeit beträgt bei den Hauptbestandteilen etwa $\pm$ 2,5%, während die Abweichungen bei den Nebenbestandteilen, die weniger als 5% des Gesamtgemisches ausmachen, bis auf etwa $\pm$ 15% ansteigen können, wie z.B. beim Arabit.

In Tab.2 werden die einzelnen Operationen schematisch dargestellt, die für eine quantitative Analyse nach dieser Methode notwendig sind.

Tabelle 2. *Quantitative photometrische Analyse von Zucker-Zuckeralkoholgemischen*



Nach der Vorbereitung der Streifenchromatogramme beginnt mit der Aufgabe des Fließmittels die eigentliche Trennung. Durch Zwischentrocknung und wiederholte Aufgabe von Fließmittel — also durch „Multiple

Development" — kann eine schärfere Begrenzung und eine geringere Breite der Banden erreicht werden. Nach Abschluß der vorgesehenen Laufzeit wird das trockene Chromatogramm rasch und gleichförmig durch die Lösung des Silbersalzes in wasserhaltigem Aceton gezogen, zunächst bei Zimmertemperatur in feuchter Ammoniakatmosphäre und anschließend im Wärmeschrank bei gleichmäßig 85° C entwickelt. Dabei entstehen tiefbraune Flecke auf hellbraunem Untergrund, die nach dem Fixieren, Wässern und Trocknen reinschwarz auf hellgrauem Grund hervortreten.

Wenn auf diese Weise für eine vollständige Analyse des vorliegenden Substanzgemisches 2—3 Streifenchromatogramme unter Anwendung verschiedener Fließmittel fertig entwickelt sind, werden von jedem einzelnen Streifen zunächst die Photogramme hergestellt, die Flächen unter den Maxima planimetriert und nach der beschriebenen Fehlerkorrektur zur Berechnung der Konzentration der Substanzen in der Analysenlösung eingesetzt.

Tab. 2 läßt ermessen, daß für eine Analyse nach der beschriebenen Methode zwar ein erheblicher Arbeits- und Zeitaufwand notwendig ist — eine solche vollständige Analyse dauert einschließlich Auswertung etwa 3 Tage — aber es gelingt mit ihrer Hilfe die Trennung und quantitative Bestimmung selbst so schwieriger Substanzgemische, wie der hier betrachteten partiell hydrierten Vorzuckerlösungen, mit befriedigender Genauigkeit.

Zusammenfassung

Die Verfasser berichten über eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Zuckern und Zuckeralkoholen, wie sie in partiell hydrierten Holzhydrolysaten vorliegen können, die nebeneinander mehr als 10 Komponenten enthalten, nämlich Galaktose, Glucose, Mannose, Arabinose, Xylose, ferner Fructose und die entsprechenden Zuckeralkohole Dulcit, Sorbit, Mannit, Arabit, Xylit und außerdem noch Di-, Tri- und höhere Saccharide.

Die Trennung wird mit Hilfe verschiedener, auf die Zusammensetzung abgestimmter Laufmittel auf streifenförmigen Papierchromatogrammen erreicht. Nach der Entwicklung werden die bandenförmigen Substanzflecke photometrisch ausgewertet.

Es eröffnet sich die Möglichkeit, diese Methode besonders in solchen Fällen anzuwenden, wenn Gemische aus zahlreichen Substanzen mit chemisch und physikalisch sehr ähnlichen Eigenschaften getrennt und quantitativ bestimmt werden sollen.

Summary

The authors describe a method for the quantitative analysis of sugars and sugaralcohols, as e.g. in partial hydrogenated hydrolysates of wood

containing more than 10 different compounds: galactose, mannose, arabinose, xylose, fructose and the sugaralcohols dulcitol, sorbitol, mannitol, arabitol, xylitol and furthermore higher saccharides.

The samples to be analyzed are chromatographed on paper strips by different special solvent mixtures. After development the coloured bands of the various substances are evaluated by a photometer.

This method opens possibilities especially in cases where it is necessary to analyze mixtures of several physical and chemical similar substances.

Literatur

[1] Durso, D. F., u. W. A. Müller: Analyt. Chemistry **28**, 1366 (1956); vgl. diese Z. **156**, 313 (1957). — [2] Fischer, F. G., u. H. Dörfel: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **297**, 164 (1954); vgl. diese Z. **148**, 310 (1955/56). — [3] Frommhold, K.: Diplomarbeit 1958. — [4] Grassmann, W., u. K. Hannig: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **290**, 1 (1952). — Klin. Wschr. **32**, 838 (1954); vgl. diese Z. **140**, 293 (1953). — [5] Jayme, G., H Knolle, H. Krehbiel u. U. Ziemer: Schr. Ver. Zellstoff- u. Papier-Chem. u. -Ing. **27**, 303 (1958). — [6] Jeanes, A., C. S. Wise u. R. J. Dimler: Analyt. Chemistry **23**, 415 (1951); vgl. diese Z. **136**, 142 (1952). — [7] Jeschek, G.: Diplomarbeit 1957. — [8] Merck AG., Darmstadt: Chromatographie unter besonderer Berücksichtigung der Papierchromatographie, 2. Aufl., S. 138. — [9] Schoenemann, K.: Dechema Monogr. **34**, 92 (1959). — [10] Schoenemann, K.: Vortrag auf dem Kongreß der Ernährungs- und Landwirtschafts-Organisation der Vereinten Nationen in Stockholm am 27. Juli 1953.

Prof. Dr. K. Schoenemann, Dipl.-Chem. G. Jeschek und Dipl.-Chem. K. Frommhold, Institut für Chemische Technologie der Technischen Hochschule Darmstadt

---

Der heutige Stand der Gaschromatographie — eine Übersicht

Von

A. I. M. Keulemans

(Referat)

Vor $1^1/_2$ Jahren wurde in Freiburg[1] die Anwendung der Gaschromatographie mit gepackten Säulen für analytische Zwecke ausführlich behandelt. Nur kurz wurde auf die neuen Entwicklungen der Capillarsäulen und eng verknüpft damit der Ionisationsdetektoren, sowie auf die präparativen Möglichkeiten der Gaschromatographie hingewiesen.

In der Zwischenzeit sind viele Arbeiten über Capillarsäulen und Ionisationsdetektoren veröffentlicht worden. Dabei hat sich neben den

[1] Diese Z. **170**, 212 (1959).

großen Vorteilen deutlich gezeigt, daß es noch nicht gelungen ist, mit dieser neuen Arbeitsweise in der Analyse vollkommen zufriedenstellende Ergebnisse zu erzielen. Einerseits ist das Problem der genauen Dosierung von Probengrößen im Mikrogrammbereich, die zum Erreichen einer hohen Trennleistung notwendig sind, noch nicht gelöst, anderseits ist die quantitative Auswertung der von den Ionisationsdetektoren gelieferten Chromatogramme noch problematisch.

Professor Dr. A. I. M. KEULEMANS,
Technische Hogeschool Eindhoven, Insulindelaan 2 (Niederlande)

Organisch-chemisches Laboratorium der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich

Zusammenhänge zwischen Struktur und gaschromatographischen Daten organischer Verbindungen

Von
E. SZ. KOVÁTS

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 20. Oktober 1960)

Im Laufe einer Analyse sind Regeln, die eine Voraussage gaschromatographischer Daten erlauben, in vielen Fällen eine große Hilfe, besonders für die Identifizierung von Substanzen. Solche Regeln können auf Grund von Zusammenhängen zwischen der Struktur und den gaschromatographischen Daten organischer Verbindungen abgeleitet werden. Will man derartige Zusammenhänge finden, so müssen die gaschromatographischen Daten mit Hilfe eines Systems charakterisiert werden, das erstens eine gute Übersicht über mehrere hundert Daten erlaubt, zweitens einen Vergleich von gaschromatographischen Daten, die an verschiedenen stationären Phasen bestimmt wurden, ermöglicht. Ich möchte vorerst die Bestimmung und Eigenschaften jener charakteristischen Größe erläutern, die wir beim gaschromatographischen Arbeiten verwenden: den Retentionsindex.

Für die Definition des Retentionsindex diente das analoge p_H-System als Modell. Wenn man die Acidität einer wäßrigen Lösung charakterisieren möchte, kann man folgendermaßen verfahren: Zwei Lösungen werden bereitet, die eine Lösung stärker, die andere schwächer sauer wie die Lösung, welche charakterisiert werden soll. Nehmen wir an, daß die Acidität der zu charakterisierenden Lösung X zwischen die Aciditäten einer 0,1 n und einer 0,01 n Lösung einer vollkommen dissoziierten Säure

fällt, so können wir die Acidität dieser Lösungen als 1 und 2 p_H-E beschreiben und die Acidität der Lösung X durch eine logarithmische Interpolation zwischen 1 und 2 charakterisieren oder, wenn wir zwei Indicatoren finden können, die bei p_H 1 und p_H 2 die Farbe wechseln, so kann die logarithmische Interpolation mit Hilfe der Indicatoren ausgeführt werden.

Dieses System kann leicht auf das gaschromatographische Problem übertragen werden. Die Glieder von homologen Reihen liefern ein Analogon für die Reihe von Standardlösungen oder für eine Reihe von Indicatoren. Es ist naheliegend, von den zur Verfügung stehenden homologen Reihen die einfachste: die homologe Reihe der n-Paraffine als Indicatorreihe zu benützen. Eine Unregelmäßigkeit innerhalb dieser Reihe kann sich allerdings unangenehm auswirken, nämlich die Oscillation mancher physikalischer Eigenschaften zwischen den Gliedern mit gerader und ungerader C-Anzahl. Um die Möglichkeit eines solchen oscillierenden Effektes von vorneherein auszuschließen, wird nur die Hälfte der homologen Reihe, und zwar diejenige der n-Paraffine gerader C-Anzahl, als Indicatorreihe benützt. Das System der Charakterisierung wird nun wie folgt aufgebaut:

Jene Stelle im Chromatogramm, wo das Maximum des Äthan-Piks (C_2H_6) erscheint, wird als 200 Index-Einheiten definiert, die Stelle des Maximums des Butan-Piks als 400, diejenige des Hexan-Piks als 600; d. h. *jene Stelle im Chromatogramm, an welcher das Maximum eines n-Paraffins C_zH_{2z+2} mit gerader C-Anzahl z erscheint, wird als 100 z gesetzt, und zwar für jede stationäre Phase und bei jeder Kolonnentemperatur.* In einer Gleichung zusammengefaßt

$$I^{St.\,Ph.}_{Temp.}\,(nC_zH_{2z+2}) = 100\,z$$
$$z\text{: eine gerade Zahl.} \qquad (1)$$

Der Retentionsindex einer beliebigen Substanz X wird nun wie in dem analogen p_H-System durch die logarithmische Interpolation zwischen einem Standardverbindungspaar errechnet.

Abb. 1 zeigt, wie diese Rechnung *in praxi* ausgeführt wird.

In der oberen Hälfte des Bildes ist das Chromatogramm der homologen Reihe der n-Paraffine gezeichnet; die Glieder mit ungerader C-Anzahl werden dem Eichgemisch auch beigefügt. Die Aufgabe besteht darin, die Stelle der Pik-Maxima im zweiten Chromatogramm zu charakterisieren. Die zwei Chromatogramme wurden unter gleichen Versuchsbedingungen ausgeführt. Zwischen den beiden Chromatogrammen ist ein speziell für gaschromatographische Zwecke bereiteter Maßstab abgebildet, an welchem direkt der Logarithmus der Distanzen ablesbar ist. Zuerst wird mit Hilfe der Stickstoffchromatogramme am Schieber dieses Maßstabes die

Entfernung zwischen Start und Maximum des Stickstoff-Piks eingestellt, diese Distanz entspricht dem Gasraumvolumen. Wird nun die Marke am Schieber als Nullmarke benützt, so können direkt die Logarithmen der reduzierten Distanzen, $\log d'$, abgelesen werden. Diese sind bei den Maxima angeführt. Die Retentionsindices können nun mit Hilfe dieser Zahlen leicht errechnet werden, wie es in der Figur am Beispiel des vierten Piks angegeben ist: Die logarithmische Strecke zwischen dem Pik des

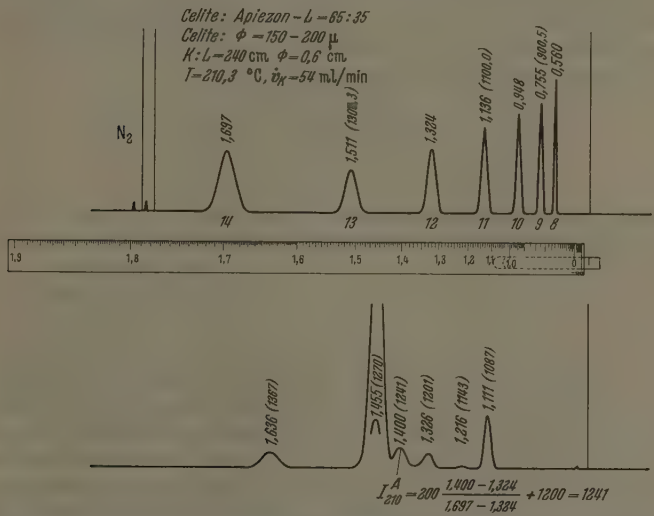


Abb. 1. Errechnung von Retentionsindices durch logarithmische Interpolation zwischen Standardverbindungen. (Logarithmischer Maßstab: Maßstabfabrik Schaffhausen AG, Schaffhausen, Schweiz)

Tetradecans und des Dodecans ($\log d'_{14} - \log d'_{12}$) beträgt *per definitionem* 200 Index-Einheiten; gesucht wird die Entfernung des vierten Piks vom Maximum der Indicatorsubstanz Dodecan.

$$(\log d'_{14} - \log d'_{12}) : 200 = (\log d'_x - \log d'_{12}) : x \,. \tag{2}$$

Daraus errechnet sich die Strecke x

$$x = 200 \frac{\log d'_x - \log d'_{12}}{\log d'_{14} - \log d'_{12}} \,. \tag{3}$$

Der Retentionsindex ist

$$I = x + 1200 \,, \tag{4}$$

weil die Substanz von Dodecan x Index-Einheiten entfernt ist und der Index des Dodecans 1200 beträgt.

Für den allgemeinen Fall einer Substanz Y lautet die Gl. (4) folgendermaßen:

$$I^{St.Ph.}_{Temp.}(Y) = 200\,\frac{\log d'_Y - \log d'_z}{\log d'_{z+2} - \log d'_z} + 100\,z\,. \qquad (5)$$

Bedingungen: *a)* $d'_z < d'_Y < d'_{z+2}$

b) z symbolisiert ein n-Paraffin C_zH_{2z+2} und ist eine gerade Zahl.

Selbstverständlich müssen Chromatogramm und Eichchromatogramm unter identischen Versuchsbedingungen ausgeführt werden. In der ursprünglichen Definition des Retentionsindex:

$$I^{St.Ph.}_{Temp.}(Y) = 200\,\frac{\log V_N(Y) - \log V_N(z)}{\log V_N(z+2) - \log V_N(z)} + 100\,z \qquad (6)$$

$$V_N(z) < V_N(Y) < V_N(z+2)$$

wird das Netto-Retentionsvolumen V_N zur Definition benützt. Werden jedoch alle experimentellen Bedingungen konstant gehalten, so vereinfacht sich Gl. (6) zu Gl. (5).

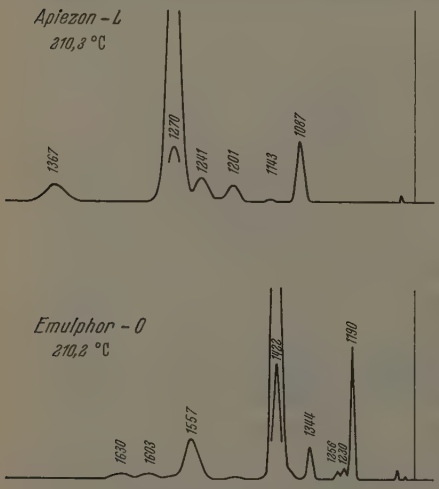
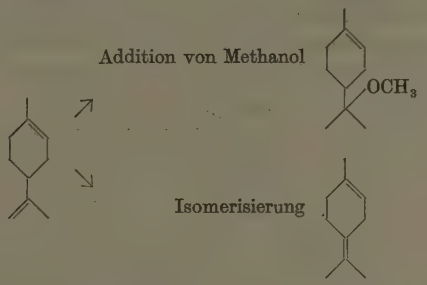


Abb. 2. Ausgewertete Chromatogramme des gleichen Reaktionsproduktes an A: Apiezon-L und P: Emulphor-O

Die mit Hilfe von Gl. (5) errechneten Retentionsindices sind bei den Maxima der Pike in Klammern eingesetzt. Die Retentionsindices der n-Paraffine im Indicator-Chromatogramm mit ungerader C-Anzahl fallen auf ganze Hunderter, wie es auch an anderen bis jetzt untersuchten stationären Phasen der Fall ist. Diese Tatsache, daß im Retentionsindex zwischen den geraden und ungeraden Gliedern der homologen Reihe keine Oscillation auftritt, erlaubt eine einfache Kontrolle der Richtigkeit der numerischen Rechnung.

In Abb. 2 sind ausgewertete, an zwei verschiedenen stationären Phasen aufgenommene Chromatogramme des gleichen Reaktionsproduktes dargestellt. Limonen wurde in verdünnter methanolischer Lösung mit Schwefelsäure als Katalysator bei Zimmertemperatur stehengelassen. Nach drei Tagen wurde das Reaktionsgemisch mit gesätt. Bicarbonatlösung neutralisiert,

vom Methanol befreit, getrocknet und unter Wasserstrahlvakuum destilliert. Der dritten Destillationsfraktion wurden zwei Proben vom 1,6 μl entnommen, und an Apiezon-L (Hochvakuumfett, bestehend hauptsächlich aus gesätt. Paraffinkohlenwasserstoffen) und an Emulphor-O (ein Polyäthylenglykol, einseitig veräthert mit Octadecylalkohol) als stationäre Phase bei 210° C chromatographiert. Zwei Reaktionswege sind möglich: der erste ist die Addition von Methanol an die Doppelbildungen des Limonens, wobei wahrscheinlich zur Hauptsache der Methyläther des α-Terpineols entsteht,



der zweite ist eine Isomerisierung des Limonens zu anderen Monoterpen-Kohlenwasserstoffen. Aus den im Anhang tabellierten Retentionsindices der Monoterpen-Kohlenwasserstoffe kann geschlossen werden, daß der erste größere Pik unverändertes Limonen ist, da die Retentionsindices an beiden stationären Phasen mit denen der Tabellenwerte des Limonens befriedigend übereinstimmen (Chromatogramm: $I^A_{210} = 1087$; $I^P_{210} = 1190$, Tabellenwerte: $I^A_{210} = 1089$; $I^P_{210} = 1189$). Der kleine Pik im Chromatogramm an der Apiezon-L-Kolonne mit dem Index 1143 (Tabellenwert $I^A_{210} = 1141$) ist wahrscheinlich Terpinolen. Gemäß der Tabelle soll diese Substanz an der stationären Phase Emulphor-O bei 1257 erscheinen, und in Übereinstimmung damit finden wir im Chromatogramm den kleinen Pik bei 1256 Index-Einheiten. Das unmittelbar dem Limonen-Pik folgende Maximum an der stationären Phase Emulphor-O ist p-Cymol (Chromatogramm: $I^P_{210} = 1230$, Tabellenwert: $I^P_{210} = 1229$). Diese Substanz war als Verunreinigung im zur Reaktion verwendeten Limonen enthalten. Der kleine Pik, der dieser Substanz an der stationären Phase: Apiezon-L entspricht, ist bei der gegebenen Trennschärfe der Kolonne vom Limonen-Pik nicht abgetrennt (Tabellenwerte: I^A_{210} (Limonen) = 1089, I^A_{210} (p-Cymol) = 1079. Die Substanzen mit höheren Retentionsindices an der stationären Phase Apiezon-L sind wahrscheinlich die gesuchten Methyläther. (In der Tabelle finden sich keine höheren Retentionsindices als 1151 [$\Delta^{2,3}\Delta^{4,8}$-p-Menthadien], die einem Monoterpen-Kohlenwasserstoff entsprechen).

Nach diesem Beispiel einer Analyse mit Hilfe von Retentionsindices sei auf eine der vorteilhaften Eigenschaften des Retentionsindex hingewiesen. Gegenüber anderen zur Charakterisierung organischer Verbindungen verwendeten gaschromatographischen Größen weist der Retentionsindex einen sehr kleinen und linearen Temperaturgang auf. Eine Ausnahme bilden kleine Molekeln, wie z.B. Methanol, Methylbromid usw., d.h. solche Substanzen, bei welchen die funktionelle Gruppe über dem organischen Rest dominiert. Sogar bei diesen Substanzen weicht die Temperaturabhängigkeit über einen Bereich von etwa 50° C von der Linearität nicht merklich ab.

Um diese lineare Temperaturabhängigkeit zu illustrieren, sollen die Meßresultate für Limonen als Stichprobe herausgegriffen werden (Tab. 1).

Tabelle 1. *Retentionsindex von Limonen*

an	bei 150°	170°	190°	210° C
Apiezon-L	1067	1074	1081	1089
		7	7	8
Emulphor-O	1174	1178	1183	1188
		4	5	5

Die wichtigsten Zusammenhänge zwischen Struktur und gaschromatographischen Daten organischer Verbindungen können in 4 Regeln zusammengefaßt werden.

Regel 1. *Die Retentionsindices der höheren Glieder einer homologen Reihe nehmen mit jeder zusätzlichen Methylengruppe um 100 Index-Einheiten zu.*

Ein erstes Beispiel dieser Art lieferte die homologe Reihe der n-Paraffine, indem die Retentionsindices der Paraffine mit ungerader C-Anzahl auf ganze Hunderter fallen. Die analoge Regelmäßigkeit kann an den stationären Phasen Apiezon-L und Emulphor-O in der Reihe der primären n-Alkohole (über C_5), weiterhin in der Reihe der n-Aldehyde, Ester, Ketone, usw. beobachtet werden. Die Nützlichkeit dieser Regel soll an einem einfachen Beispiel illustriert werden:

Aus einem ätherischen Öl wurde eine Substanz isoliert, mit den Retentionsindices: $I^A_{190} = 1152$ und $I^P_{190} = 1385$ Index-Einheiten. Die Spektra im Infraroten und Ultravioletten ließen vermuten, daß es sich um das Acetat eines wahrscheinlich gesättigten und unverzweigten Fettalkohols handelt. Die gaschromatographischen Daten solcher Acetate wurden früher an den zwei verwendeten stationären Phasen A: Apiezon-L und P: Emulphor-O bis und mit dem Acetat des Pentanol-(1) bestimmt, wie sie in Tab. 2 zusammengestellt sind.

Die Retentionsindices nehmen in der Tat an beiden stationären Phasen um 100 Index-Einheiten zu. Der Unterschied der Retentionsindices des Pentanol-(1)-acetates und des zu identifizierenden Acetates beträgt 300 an beiden stationären Phasen. Später wurde auch der chemische Beweis erbracht, daß die Substanz das Acetat des Octanols-(1) war.

Tabelle 2. *Retentionsindices bei 190° C*

von	an	
Acetat des	Apiezon-L	Emulphor-O
Propanol-(1)	648	884
	107	97
Butanol-(1)	755	981
	100	102
Pentanol-(1)	855	1082
	297	303
Alkohol *X*	1152	1385

Die zweite Regel kann mit Hilfe der graphischen Darstellung der Abb. 3 abgeleitet werden. Die an einer apolaren stationären Phase bestimmten Retentionsindices zeigen mit dem Siedepunkt der Substanzen eine grobe Korrelation.

Diese Korrelation kann weitgehend verbessert werden, wenn die zur Darstellung herangezogenen Substanzen gruppiert werden: Die erste Gruppe enthält die aliphatischen und aromatischen Kohlenwasserstoffe, ihre Chlor- und Bromderivate sowie Äther — im allgemeinen Substanzen mit einer nur geringen Polarität. Die zweite Gruppe wird aus stärker polaren Verbindungen: Ketonen, Aldehyden und Estern gebildet; die dritte Gruppe enthält die Alkohole. Die drei Ausgleichskurven sind fast linear und fast parallel. Auf Grund dieser Tatsache kann für chemisch ähnliche Substanzen von ähnlichem Siedepunkt die zweite Regel formuliert werden:

Regel 2. *Beträgt der Unterschied des Siedepunktes zweier Isomeren δt_s, dann ist der Unterschied zwischen ihren Retentionsindices an einer „apolaren" stationären Phase gegeben durch:*

$$\delta I \approx 5\, \delta t_s\,. \tag{7}$$

Unter „apolaren" stationären Phasen werden jedoch nur solche verstanden, die aus einem Gemisch von Paraffinkohlenwasserstoffen bestehen (vgl. auch Regel 3). Das folgende Beispiel illustriert die Anwendung dieser Regel:

Terpinolen wurde als Referenzsubstanz benötigt. Von einer Firma erhielten wir „Terpinolen", dessen Chromatogramm in Abb. 4 dargestellt ist.

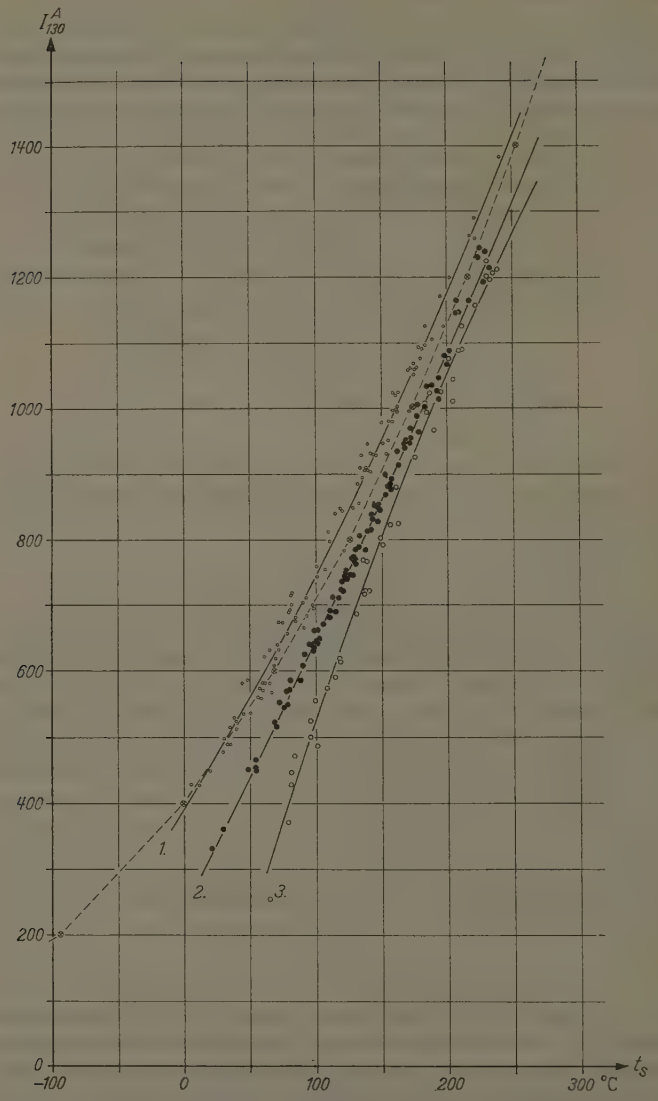


Abb. 3. Korrelation der Retentionsindices mit dem Siedepunkt. Die gestrichelte Linie verbindet die n-Paraffine. Die Gruppen *1*, *2* und *3*: siehe Text

Es stellte sich somit die Frage: welche der Komponenten des Gemisches soll mit Hilfe der präparativen Gaschromatographie isoliert werden? Die

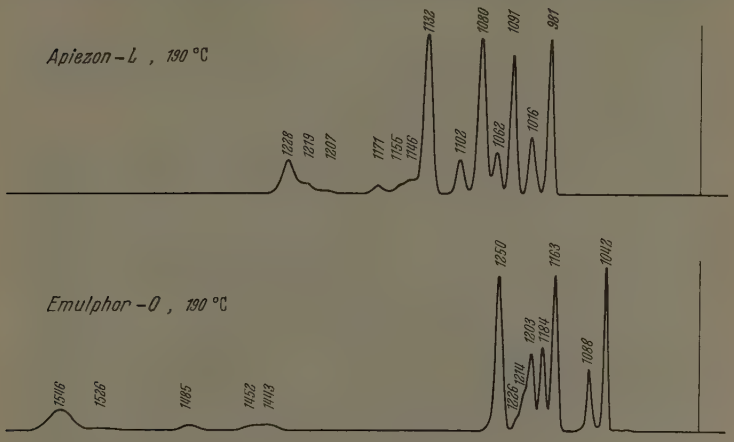


Abb. 4. Chromatogramm von „Terpinolen"

gaschromatographischen Daten des isomeren Limonens waren uns bekannt. Der Siedepunkt des Limonens beträgt 178° C und der des Terpinolens 187° C, so daß der Unterschied δt_s sich auf 9° C errechnet.

	Limonen	Terpinolen	
t_s	178°	187°	$\delta t_s = 9°$
I^A_{190}	1082	$1082 + 45 = 1127$	$\delta I \approx 45$ I.E.

Apiezon-L ist eine „apolare" stationäre Phase, der Retentionsindex des Limonens ist $I^A_{190} = 1082$; auf Grund des Siedepunktunterschiedes können wir daraus den Retentionsindex des Terpinolens abschätzen, I^A_{190} (Terpinolen) $\approx 1082 + 5 \cdot 9 = 1127$. Aus dem Gemisch wurde die Substanz, welche dem Pik mit dem Retentionsindex $I^A_{190} = 1132$ entspricht, isoliert und auf ihre Identität mit Terpinolen überprüft.

Die ersten zwei Regeln beziehen sich auf Regelmäßigkeiten, die innerhalb der Gruppen von Retentionsindices auftreten, welche an *einer* stationären Phase bestimmt worden sind. Weitere Regeln existieren für

den Vergleich von Retentionsindices der gleichen Substanz an mehreren stationären Phasen; die erste Regel dieser Art lautet wie folgt:

Regel 3.

a) Der Retentionsindex einer „apolaren" Verbindung bleibt für beliebige stationäre Phasen nahezu konstant.

b) Der Retentionsindex einer beliebigen Verbindung bleibt für „apolare" stationäre Phasen nahezu konstant.

Unter „apolaren" stationären Phasen werden — wie bei Regel 2 — nur solche verstanden, die aus einem Gemisch vom gesättigten acyclischen Paraffinkohlenwasserstoffen bestehen (Squalan, Paraffinöl, Polyäthylen usw.). Die apolaren Substanzen sind analog definiert. Die Grundlage der Regel 3 ist auch jene, die der Verallgemeinerung der Regel 2 für beliebige „apolare" stationäre Phasen zugrunde liegt, obwohl diese Regel nur auf Grund der Resultate an Apiezon-L abgeleitet wurde.

Die Gültigkeit der Regel 3a soll an Hand einiger Substanzen illustriert werden, die von verschiedenen Autoren gaschromatographisch charakterisiert worden sind (siehe Tab. 3).

Tabelle 3. *Retentionsindices „apolarer" Substanzen*

	p-Phenyl-diphenyl-methan 78,5° C[1]	Siliconöl 100° C[2]	Trikresyl-phosphat 100° C[3]	Perfluor-tributyl-amin 52° C[3]	Emulphor-O 70° C[4]	Apiezon-L 70° C[4]
2-Methylpentan	569	579	568	551	568	570
2-Methylhexan	668	662	667	655	—	—
2-Methylheptan	759	761	760	751	—	—
2,3-Dimethylbutan	566	—	—	—	567	570
2,2,4-Trimethyl-pentan	680	—	—	—	685	690

Die vierte und letzte Regel vergleicht das gaschromatographische Verhalten einer Verbindung an einer „apolaren" mit dem an einer gegebenen „polaren" stationären Phase. Das unterschiedliche Verhalten einer Verbindung an zwei stationären Phasen wird im Unterschied ΔI seiner Retentionsindices an diesen zwei Phasen ausgedrückt. Um ein Beispiel herauszugreifen: Der Retentionsindex des Octanols-(1) an der stationären Phase Apiezon-L ist bei 190° C: $I^A_{190} = 1038$ an der stationären Phase Polyäthylenglykol (Emulphor-O) bei der gleichen Temperatur: $I^P_{190} = 1390$. Das unterschiedliche Verhalten wird nun im ΔI-Wert für die Substanz Octanol-(1) wie folgt ausgedrückt:

$$\Delta I^{P,A}_{190} = I^P_{190} - I^A_{190} = 352 \text{ Index Einheiten.} \qquad (8)$$

Die dritte Regel besagt, daß der Retentionsindex gesätt. Paraffine für beliebige stationäre Phasen konstant bleibt, oder anders ausgedrückt: Ihr ΔI-Wert ist für beliebige Paare stationärer Phasen gleich Null.

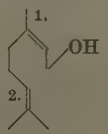
Auf Grund dieser Regel kann nun die stärkere Retention des Octanols-(1) an der polaren stationären Phase auf folgende Vorstellung zurückgeführt werden: Der ΔI-Wert des aliphatischen Restes des Octanols-(1) ist Null, so daß die gesamte zusätzliche Retention auf den Einfluß des Molekelbezirkes C-OH zurückgeführt werden kann. Solche ausgezeichnete Molekelbezirke werden im folgenden als „Haftzone" bezeichnet. Der Name Haftzone will ausdrücken, daß ein solcher Molekelbezirk in einer nicht-polaren stationären Phase stärker haftet, als in einer „apolaren" stationären Phase.

Die vierte Regel wird nun wie folgt formuliert:

Regel 4. *Enthält eine Verbindung mehrere Haftzonen, so kann ihr ΔI-Wert in vielen Fällen additiv aus den Inkrementen, die den einzelnen Haftzonen zukommen, errechnet werden.*

Allerdings läßt sich eine solche Berechnung der ΔI-Werte nur auf Grund eines ausgedehnten systematischen Tatsachenmaterials durchführen. Die den einzelnen Haftzonen zukommenden Inkremente müssen tabellarisch zusammengestellt zur Verfügung stehen. Solche Inkremente sind für das Paar Apiezon-L und Emulphor-O bestimmt worden. An Hand dieser Tabellen soll dieses Verfahren am Beispiel des Nerols illustriert werden:

Die Verbindung Nerol besitzt drei Haftzonen,



die Hydroxylgruppe und die zwei Doppelbindungen. Die den einzelnen Haftzonen zukommenden Inkremente sind für eine Kolonnentemperatur von 130° C folgende:

Hydroxylgruppe:	367 (— 2,5)
1. Doppelbindung:	24 (+ 0,3)
2. Doppelbindung:	31 (+ 0,4)
Total	422 (— 1,8)

Die in Klammern stehenden Zahlen bedeuten den Temperaturgang der Inkremente für 10° C.

Experimentell wurde für Nerol ein ΔI_{130}-Wert von 419 (— 1,9) gefunden. Da die Berechnung die Möglichkeit eines Unterschiedes zwischen cis- und trans-Isomeren nicht berücksichtigt, wird für das isomere Geraniol der gleiche Wert für ΔI_{130} und dessen Temperaturgang gefunden. Der experimentelle Wert beträgt für Geraniol: $\Delta I_{130} = 434$ (— 1,5).

Zum Schluß soll eine Warnung ausgesprochen werden. Die Reproduzierbarkeit der Retentionsindices ist sehr gut, aber man muß sich bewußt sein, daß sekundäre Effekte des sogenannten inaktiven festen Trägers die gaschromatographischen Daten etwas beeinflussen können. Einige experimentelle Resultate werden dies illustrieren (Tab. 4).

Tabelle 4. *Retentionsindices bei 190° C*

	P	PC	
α-Terpineol	1556	1548	8
β-Terpineol	1498	1482	16
Furfurol	1287	1246	23
Decanol-(1)	1590	1598	—8

Die erste Kolonne (P) zeigt Retentionsindices einiger Substanzen an der stationären Phase Emulphor-O. Zu Ihrer Vorbereitung wurde gesiebtes mit Säure gewaschenes Celite verwendet. Für die Bereitung der stationären Phase mit der Bezeichnung PC wurde das mit Säure gewaschene Celite mit 1,5 Gew.-% Natriumhydroxyd behandelt, nachträglich in Kohlendioxyd-Atmosphäre auf 360° C erhitzt. Diese Behandlung wurde durchgeführt, um die katalytischen Eigenschaften des Celite durch Zerstörung seiner sauren aktiven Zentren zurückzudrängen. Die Pike sind an einer stationären Phase, die mit vorbehandeltem Celite bereitet wurde, symmetrischer. Dafür zeigen einige Substanzen mit relativ hohem ΔI-Wert Unterschiede im Retentionsindex. Diese Unterschiede sind nicht sehr groß, aber störend, da die Reproduzierbarkeit des Retentionsindex mit der gleichen stationären Phase bedeutend besser ausfallen sollte.

Anhang

Retentionsindices einiger Verbindungen

An jeder stationären Phase wurden die Retentionsindices bei drei oder vier äquidistanten Temperaturen bestimmt ($\Delta T = 20°$ C). An die experimentellen Punkte wurde durch eine einfache Ausgleichsrechnung eine Gerade angeglichen. Der Fehler einer Einzelmessung läßt sich an der 95%-Sicherheitsschwelle auf etwa $\pm$ 3 I-Einheiten abschätzen, d. h. daß der Fehler des Mittelwertes der drei Messungen ungefähr 2 und der Fehler des Temperaturganges ($10\partial I/\partial T$) etwa 1 I-Einheit beträgt. Bei einer Extrapolation über 100° C steigt der Fehler auf ungefähr 8 I-Einheiten an. Die beiden folgenden stationären Phasen wurden als Standard gewählt:

A: Apiezon-L: Celite = 35:65 Gewichtsverhältnis
(Durchmesser des Celite: 150—200 μ)
P: Emulphor-O: Celite = 35:65 Gewichtsverhältnis
(Durchmesser des Celite: 150—200 μ)

Emulphor-O ist ein Polyäthylenglykol (Polymerisationsgrad $\sim$ 40), einseitig veräthert mit Octadecylalkohol. Als eigentliche Kolonnen wurden Pyrex-Glasrohre von ungefähr 220 cm Länge und 0,6 cm lichter Weite verwendet. Als Trägergas diente Helium. Der Detektor ist eine Wärmeleitfähigkeitszelle der Firma Gow-Mac Co (Madison, N.J.).

Das für die Bereitung von stationären Phasen verwendete Celite (mit Säure gewaschenes Celite der Firma British Drug Houses Ltd.) wurde wie folgt vorbehandelt: b g Celite wurden mit b ml methanolischer Natronlauge angefeuchtet. Die

Tabelle 5

Substanz	I^A bei ° C				I^P bei °C				ΔI bei °C			
	Temperaturbereich	130	190	$10\frac{\partial I^A}{\partial T}$	Temperaturbereich	130	190	$10\frac{\partial I^P}{\partial T}$	130	190	$10\frac{\partial \Delta I}{\partial T}$	
α-Thujen	150—210	935	955	+ 3,3	150—210	1004	1024	+ 3,4	69	69	+ 0,1	
α-Pinen	150—210	960	985	+ 4,2	150—210	1009	1040	+ 5,1	49	55	+ 0,9	
Myrcen	150—210	976	987	+ 1,8	150—210	1098	1103	+ 0,8	122	116	— 1,0	
Camphen	150—210	984	1015	+ 5,2	150—210	1052	1087	+ 5,9	68	72	+ 0,7	
β-Pinen	150—210	1012	1043	+ 5,1	150—210	1085	1123	+ 6,4	73	80	+ 1,3	
α-Phellandren	150—210	1033	1059	+ 4,3	150—210	1126	1155	+ 4,8	93	96	+ 0,5	
α-Terpinen	150—210	1040	1062	+ 3,6	150—210	1140	1162	+ 3,7	100	100	+ 0,1	
p-Cymol	150—210	1047	1071	+ 4,0	150—210	1193	1221	+ 4,6	146	150	+ 0,6	
Limonen	150—210	1060	1082	+ 3,7	150—210	1154	1180	+ 4,4	94	98	+ 0,7	
γ-Terpinen	150—210	1085	1103	+ 3,1	150—210	1190	1213	+ 3,8	106	111	+ 0,8	
Terpinolen	150—210	1112	1134	+ 3,6	150—210	1220	1248	+ 4,7	108	114	+ 1,1	
$\Delta^{2,3}\Delta^{4,8}$-p-Menthadien	150—210	1118	1143	+ 4,2	150—210	1229	1260	+ 5,2	111	117	+ 1,0	
α,p-Dimethylstyrol	150—210	1119	1142	+ 3,8	150—210	1314	1342	+ 4,7	195	200	+ 0,9	
Carvon	190—230	1230	1261	+ 5,2	190—230	1546	1595	+ 8,1	316	334	+ 2,9	
1,8-Cineol	170—210	1049	1079	+ 5,0	170—210	1161	1199	+ 6,3	112	120	+ 1,3	
1,4-Cineol	170—210	1021	1042	+ 3,5	170—210	1135	1159	+ 4,0	114	117	+ 0,5	
Methyläther von Phenol	170—230	927	946	+ 3,3	170—230	1200	1224	+ 4,0	273	278	+ 0,7	
o-Kresol	170—230	1019	1035	+ 2,7	170—230	1268	1293	+ 4,1	249	258	+ 1,4	
m-Kresol	170—230	1030	1049	+ 3,2	170—230	1299	1324	+ 4,2	269	275	+ 1,0	
p-Kresol	170—230	1030	1052	+ 3,7	170—230	1294	1322	+ 4,7	264	270	+ 1,0	
p-Isopropylphenol	190—230	1174	1196	+ 3,7	190—230	1423	1455	+ 5,3	249	259	+ 1,6	
Carvacrol	190—230	1210	1240	+ 5,0	190—230	1463	1484	+ 3,5	253	244	— 1,5	
Thymol	190—230	1217	1233	+ 2,7	190—230	1451	1472	+ 3,5	234	239	+ 0,8	

b ml-Lösung enthielten 1,5 Gew.-% Natriumhydroxyd bezogen auf das Celite. Das feuchte Produkt wurde in einem aufsteigenden Rohr in Wirbelschicht unter Kohlendioxyd-Strom auf 360° C erhitzt. Nach dem Erkalten wurde das Celite in Siebfraktionen aufgeteilt.

Die Retentionsindices sind in Tab. 5 für zwei Temperaturen (130° bzw. 190° C) angegeben. Der Temperaturgang des Retentionsindex ist für 10° C aufgeführt (Änderung des Retentionsindex bei einem Temperaturanstieg von 10° C: $10\,[\partial I/\partial T]$).

Der Autor dankt der Firma Firmenich & Cie., Genf, für die Unterstützung der hier zusammengefaßten Arbeiten. Ein sehr großer Teil des vorgetragenen Stoffes stammt aus der Dissertation von A. Wehrli[3] (vgl. auch Wehrli u. Kováts[4]). Schließlich sei Herrn C. E. Pieper für die Bestimmung von Retentionsindices gedankt.

Literatur

[1] Desty, D. H., u. B. H. F. Whyman: Analyt. Chemistry **29**, 320 (1957); vgl. diese Z. **159**, 67 (1957/58). — [2] Tenney, H. M.: Analyt. Chemistry **30**, 2 (1958); vgl. diese Z. **164**, 413 (1958). — [3] Wehrli, A.: Diss. Eidgen. Techn. Hochschule 1959. — [4] Wehrli, A., u. E. Kováts: Helv. chim. Acta **42**, 2709 (1959).

Dr. E. sz. Kováts, Organ.-chem. Labor, Technische Hochschule, Zürich. Universitätsstraße 6 (Schweiz)

Aussprache

E. Cremer-Innsbruck: Mit der Tatsache, daß Sie den Logarithmus des Quotienten der Verzögerungszeit der Testsubstanz und der Verzögerungszeit einer Standardsubstanz als Grundlage für den Retentionsindex gewählt haben, bin ich vollkommen einverstanden. Seit langem kämpfe ich darum, daß man die Abstände der einzelnen Substanzen im chromatographischen Spektrum sinnvoll in ΔG-Werten ausdrückt, d. h. in Differenzen der freien Adsorptions- oder Lösungsenergien gegenüber einer bekannten Standardsubstanz (wir wählten z. B. ursprünglich für Gase CO_2). Indiziert man die Standardsubstanz mit s und die gefundene Substanz mit i, so ist

$$G_i - G_s = RT \ln \frac{V_{gi}}{V_{gs}}$$

(wobei $V_g = \frac{w}{g}(t_m - t_o)$, vgl. Dissertation R. Knöpfler, Innsbruck 1946, Dissertation F. Prior, Innsbruck 1947, Diskussionsbemerkung E. Cremer, Bunsen-Tagung 1950).

Man kann auch die G-Werte noch in Enthalpie- und Entropieglieder zerlegen ($G = H - TS$) und diese Beziehung zur Extrapolation auf andere Temperaturen benützen.

Die Additivitäten erklären sich dann sehr einfach als Additivitäten in den Lösungsenergien in Analogie zu den Additivitätsregeln bei Verdampfungswärmen in homologen Reihen. Bei Ihnen werden die V_{gs}-Werte definitionsgemäß als temperaturunabhängig angenommen und stellen daher im T-V_g-Diagramm eine Schar von parallelen Linien dar. Dies ist der Raster, in den Sie Ihre Werte hineinstellen. Die Rückführung des Retentionsindex auf wahre thermodynamische Größen ist eine mühsame Rechnung und verwischt den — jedenfalls bei symmetrischen Zacken — sehr einfachen Zusammenhang mit der Energie.

Man müßte natürlich anstreben, nicht nur Differenzen $G_i - G_s$, sondern für jede Substanz i den unter den Säulenbedingungen gemessenen G_i-Wert anzugeben, unter Umständen auf eine Standardtemperatur reduziert. Dazu muß man für mehrere Standardsubstanzen (mit Siedepunkten, die ein weites Temperaturintervall umfassen) die G_s-Werte direkt bestimmen und zur gefundenen Differenz addieren.

Meine Ausführungen möchte ich dahin zusammenfassen, daß dem Retentionsindex seine praktische Brauchbarkeit für Untersuchungen an bestimmten Stoffklassen nicht abzusprechen ist, möchte aber vorschlagen, daß man auf alle Fälle neben der Größe I noch den Quotienten V_{gi}/V_{gs} (oder dessen Logarithmus), die Meßtemperatur T und den Partialdruck p_i der Komponente i angibt.

E. SZ. KOVÁTS-Zürich: Der Retentionsindex wurde bewußt so abstrakt wie möglich definiert, darin hat auch die Multiplikation mit 100 ihren Grund. Die thermodynamische Bedeutung des Retentionsindex kann nämlich oftmals viel komplizierter sein, als sie zunächst zu sein scheint, d. h. sie ist nicht nur mit dem Lösungsvorgang allein zu erklären, sondern enthält auch Beiträge, die von Adsorptionserscheinungen am festen Träger und an der Oberfläche der stationären Phase (Adsorption an der Flüssigkeit) herrühren und kann möglicherweise von weiteren Grenzflächenerscheinungen abhängen. Obwohl der Größe eine unmittelbare thermodynamische Bedeutung entzogen wurde, kann man trotzdem halbquantitative Aussagen über den Lösungsvorgang machen, wenn die n-Paraffine sauber mit Hilfe einer absoluten Größe wie z. B. dem korrigierten Retentionsvolumen charakterisiert sind.

Gegen die Verwendung einer einzigen Standardsubstanz spricht, daß das chromatographische Verhalten diese Substanz bei der gleichen Temperatur wie die anderen Substanzen untersucht werden muß, und sich infolgedessen häufig sehr lange oder zu kurze und dadurch ungenaue Retentionszeiten ergeben oder aber ein rechnerisches Verfahren verwendet werden muß, um mit Hilfe von sekundären Standardsubstanzen auf die primäre Standardsubstanz rückzurechnen (vgl. „theoretische Nonan"-Methode von SMITH). Welche Möglichkeit auch gewählt wird, immer wächst der Fehler sehr stark an, je weiter die zu charakterisierende Retentionszeit von der Retentionszeit des primären Standards abweicht. Im System des Retentionsindizes ist die zu charakterisierende Retentionszeit immer zwischen zwei naheliegenden Retentionszeiten eingegabelt, so daß der Fehler im *ganzen* experimentellen Raum nahezu konstant bleibt.

X.: Das System von Herrn KOVÁTS scheint für *praktische* Zwecke geeigneter zu sein als eine thermodynamisch saubere Größe. — Jedoch fragen möchte ich folgendes: Die Logarithmen der reduzierten Distanzen log d' der homologen Reihe der n-Paraffine sind äquidistant. Ist es möglich, die Retentionsindizes durch Extrapolation zu bestimmen, d. h. mit Hilfe eines Standardsubstanzpaares eine Substanz zu charakterisieren, die nicht zwischen diesem Paar erscheint.

E. SZ. KOVÁTS-Zürich: Dies ist in der Tat möglich und oftmals zur Charakterisierung unbekannter Substanzen eine Hilfe. Dazu eichen wir mit einem den Versuchsbedingungen angemessenen Eichgemisch, das so gewählt wird, daß das n-Paraffin mit dem höchsten Molekulargewicht noch mit einer Retentionszeit von weniger als 1 Std erscheint. Komponenten mit längeren Retentionszeiten charakterisieren wir immer mit Hilfe des letzten Eichpaares. Diese extrapolierten Werte sind gut, der Fehler ist selbstverständlich etwas größer, er wächst mit der Entfernung von Eichpaar an, aber ist nicht sehr groß, wenn die Extrapolation 200 I-Einheiten nicht überschreitet. Wir extrapolierten schon 600 I-Einheiten und konnten die Substanz identifizieren.

E. HECKER-München: Diese Haftzonen und die Additivität der ihr zukommenden Inkremente haben eine Analogie in der Papierchromatographie; man kann ähnlichen Molekelbezirken ähnliche Inkremente zuordnen und ihren R_f-Wert auf diese Weise abschätzen. Interessante theoretische Ansätze, die eine papierchromatographische Konstitutionsermittlung unbekannter Substanzen ermöglichen, sind von SCHAUER u. BULIRSCH angegeben worden* und sollten auf ihre Brauchbarkeit in der Gaschromatographie überprüft werden. Eine gewisse Schwierigkeit in der Anwendung dieser Ansätze war die Unsicherheit der R_f-Werte in der Papierchromatographie, eine Größe, die man durch die sehr viel exakter bestimmbaren Retentionsvolumina der Gaschromatographie ersetzen kann.

E. BAYER-Karlsruhe: Man kann Herrn KOVÁTS zu seinen sehr schönen Ergebnissen gratulieren, die für den Organiker eine sehr wertvolle methodische Bereicherung zur Erkennung der Struktur einer Verbindung darstellen.

Wir machten mit Terpinolenpräparaten ähnliche Erfahrungen, daß sie alle nur sehr wenig Terpinolen enthalten; die beste Probe, die wir untersuchten, war noch 70% verunreinigt. Ich möchte daher fragen, wie Sie den Siedepunkt des reinen Terpinolens bestimmen konnten?

E. SZ. KOVÁTS-Zürich: Der Siedepunkt, den ich angegeben habe, ist der Literatur entnommen und nicht von uns bestimmt worden.

Y.: Ich möchte Sie fragen, wie weitgehend diese berechneten ΔI-Werte zur Strukturaufklärung beitragen können.

E. SZ. KOVÁTS-Zürich: Die Inkremente sind sehr nützlich als ein zusätzliches Kriterium in einer Beweisführung zur Strukturanalyse, sie geben außerdem einen Beitrag zur Theorie der Lösungen. Man sollte jedoch den ΔI-Wert nur mit Vorbehalt gebrauchen, da er wohl zur Orientierung günstig sein und unter Umständen eine von mehreren möglichen Strukturformeln wahrscheinlich machen kann.

Z.: Beim Beispiel des Nerols haben Sie den verschiedenen Doppelbindungen verschieden große Inkremente zugeordnet. Wie können Sie für alle Substitutionstypen ein Inkrement angeben?

E. SZ. KOVÁTS-Zürich: Es hätte zu weit geführt, wenn ich das System der Berechnung vollkommen beschrieben hätte, aber ich kann das prinzipielle Vorgehen kurz zeigen.

Zu einer Haftzone wird ein positiver Grundwert zugeordnet; von ihm muß für jeden Substituent, der diese Haftzone sterisch abschirmt, ein negativer Beitrag abgezählt werden. Um das Verfahren für die Haftzone C—OH des Nerols zu illustrieren:

Grundwert	+ 453
$R_1 = C_7$-Kette	— 82
$R_2 = H$	0
$R_3 = H$	0
β-Methyl an R_1	4
Summe	+ 367

Es ist offensichtlich, daß auf diese Weise den primären, sekundären und tertiären Alkoholen verschieden große Inkremente zugeordnet werden. Wichtig ist dabei, daß auch den sterischen Effekten mit Hilfe additiver Inkremente Rechnung getragen werden kann.

* SCHAUER, H. K., u. R. BULIRSCH: Z. Naturforsch. **10**b, 683 (1955); Naturwissenschaften **43**, 34 (1956); Z. Naturforsch. **13**b, 328 (1958).

Institut für physikalische Chemie der Universität Frankfurt a. M.

Trennleistung und Bodenzahlen bei gaschromatographischen Analysen mit Capillarkolonnen

Von

I. Halász und G. Schreyer*

Mit 10 Textabbildungen

(Eingegangen am 12. November 1960)

Die Leistungsfähigkeit von Geräten verschiedenster Art versucht man durch einfache Kenngrößen zu charakterisieren. In der Gaschromatographie hat man analog zur Destillation den Begriff eines theoretischen Bodens eingeführt. Man glaubte durch die Angabe der Anzahl der theo-

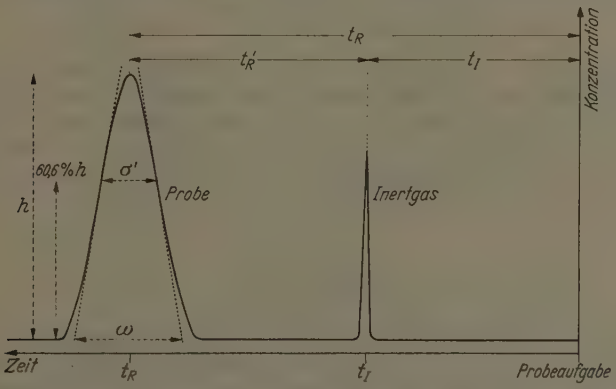


Abb. 1. Erklärung der im Text gebrauchten Symbole an Hand eines Chromatogramms. $t_I \approx t_{R_{CH_4}}$

retischen Böden einer Kolonne ein grobes einfaches Maß für deren Trennleistung geben zu können. Dieser Zahlenwert kann mit Hilfe eines Diagramms folgendermaßen berechnet werden:

$$n = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{\omega}\right)^2 \tag{1}$$

wobei hier nur eine von mehreren gleichwertigen Formeln angegeben sei[4,5]. Es bedeuten hier: n die theoretische Bodenzahl und t_R die Retentionszeit, das ist die Zeit vom Augenblick der Probeaufgabe bis zum Erscheinen des Peakmaximums**. (Abb. 1) ω ist die von den beiden Wendetangenten des Zackens auf der Zeit-Achse herausgeschnittene Zeitstrecke.

---

* Dieser Aufsatz stellt einen Teil der Promotionsarbeit von G. Schreyer dar.

** Die hier benutzten Definitionen entsprechen großenteils denen, die von der Nomenklatur-Kommission empfohlen wurden[1].

Andere Autoren definieren die Trennleistung als die Anzahl der theoretischen Böden auf einem Meter der Säule[4].

Alle, die mit Capillarkolonnen arbeiteten, mußten aber bald feststellen, daß man mit diesen Säulen Bodenzahlen erhält, die unter Umständen mehr als hundertmal größer sind als bei den gepackten Kolonnen, ohne daß aber bei ihnen die Trennleistungen derartig besser wären.

Purnell[6,7] zeigte den Zusammenhang zwischen 1. der reduzierten Retentionszeit t_R', das ist die Zeit, die zwischen dem Erscheinen des Inertgas-Peakmaximums und dem der Substanz liegt, 2. der Retentionszeit des Inertgaszackens t_I*, 3. der relativen Retentionszeit α zweier benachbarter zu trennenden Substanzen und 4. der für die genannte Trennung *nötigen Bodenzahl* n':

$$n' = \left(\frac{6\alpha}{\alpha - 1}\right)^2 \cdot \left(1 + \frac{t_I}{t_{R_2}'}\right)^2 \quad (2)^{**} \qquad \alpha = \frac{t_{R_2}'}{t_{R_1}'}. \tag{3}$$

Danach wird n' um so größer, je näher die beiden Peaks beim Inertgaszacken liegen und je länger dessen Retentionszeit im Vergleich zu den reduzierten Retentionszeiten der zu trennenden Substanzen ist. t_I/t_{R2}', das in diesem Falle groß ist, wird durch das Verhältnis des Gasvolumens V_g zu der Kapazität der stehenden Phase $k \cdot V_{fl}$ in der Trennsäule bestimmt:

$$\frac{t_I}{t_R'} = \frac{V_g}{k \cdot V_{fl}} = \frac{1}{k'} \tag{4}$$

$$t_R' = k' \cdot t_I. \tag{4a}$$

k ist der Verteilungskoeffizient bezogen auf 1 cm³ gasförmiger bzw. stehender Phase. k' stellt einen Verteilungskoeffizienten dar, der auf die Menge der beiden Phasen in der Säule bezogen wurde. k' ist bei Capillarkolonnen kleiner als bei gepackten, da V_g/V_{fl} bei den ersteren fast immer größer ist als bei den klassischen Säulen. Bei Capillarkolonnen braucht man also bei der gleichen reduzierten Retentionszeit t_R' oder noch ungünstiger bei der gleichen Retentionszeit t_R

$$t_R = t_I + t_R' \tag{5}$$

eine wesentlich höhere Bodenzahl, um eine Substanz von einer benachbarten abzutrennen als bei gepackten Säulen. Dieses Phänomen würde gegen die Verwendung von Capillarkolonnen sprechen, wenn mit diesen nicht außerordentlich hohe Bodenzahlen verhältnismäßig leicht zu

* Infolge der schwierigen Messung der Retentionszeit eines Inertgases bei Capillarkolonnen bestimmten wir statt dessen die Retentionszeit des Methans ($k' \approx 0$).

** In diesem Falle liegen die Peakspitzen der beiden Komponenten 3 Peakhalbwertsbreiten σ' (siehe Abb. 1) auseinander.

erhalten wären. Bodenzahlen von einigen Hunderttausend sind bei Capillarsäulen keine Seltenheit. Dagegen erfordert die Erzielung von etwa 5000 theoretischen Böden bei gepackten und nicht unter extremen Bedingungen arbeitenden Säulen Erfahrung und einiges experimentelles Geschick. In bezug auf die Analysendauer stört ein großes t_I kaum, da bei Serienuntersuchungen eine neue Probe um t_I sec vor dem Ende der vorhergehenden Analyse aufgegeben werden kann. Bei Capillarkolonnen ist nämlich im allgemeinen bei der Probeaufgabe keine Druckwelle am

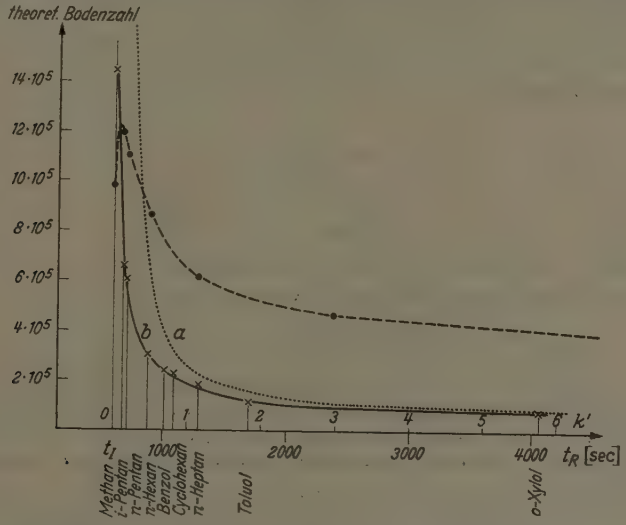


Abb. 2. Abhängigkeit der theoretischen Bodenzahl von der Retentionszeit bzw. von k'. Zu den experimentellen Werten: Kolonne: Kupfer, Länge: 140 m; ⌀: 0,3 mm; stehende Phase: 0,33 μ Squalan; Trägergas: N_2; Strömungsgeschwindigkeit 23,5 cm/sec; Temp.: 60° C. — k' = red. Retentionszeit der Probe (t_R')/Retentionszeit des Inertgases (t_I). a $n = n_{Grenz} \cdot (1 + 1/k')^2$ (PURNELL); n_{Grenz} = 65000; b experimentelle Werte; c berechnete Werte (nach GOLAY)

Säulenausgang zu beobachten. Mißt man auf diese Art, so tritt die reduzierte Retentionszeit t_R' der letzten Komponente einer Probe als Analysendauer auf.

Wie schon erwähnt, steigt die zur Trennung zweier Substanzen benötigte Bodenzahl n' sehr schnell an, je größer das Verhältnis t_I/t_{R2}' wird. Aber es läßt sich auch experimentell zeigen, daß bei Capillarkolonnen die Bodenzahlen für Stoffe, die bald nach dem Inertgas aus der Kolonne austreten, wesentlich größer sind als für später kommende. Auch nach der von GOLAY[3] für die Höhe eines theoretischen Bodens angegebenen Formel kann man ein Ansteigen der Bodenzahlen für kleine reduzierte Retentionszeiten berechnen. Abb. 2 zeigt die nach den

drei genannten Methoden erhaltenen Kurven. a wurde nach der Gleichung von Purnell bestimmt, wobei angenommen wurde, daß die Trennwirkung benachbarter Komponenten $\left(\frac{\alpha}{\alpha-1}\right)$ konstant bleiben und daß diese berechnete Kurve bei großen Retentionszeiten ($k' \gg 1$) mit der experimentell erhaltenen Kurve b übereinstimmen soll. Kurve a strebt für $k' \to \infty$ einem Grenzwert n_{Grenz} zu, der in diesem Falle bei 65000 liegt. Kurve c wurde nach der von Golay angegebenen Formel erhalten.

Nach Gl. (2) ist

$$n' = \left(\frac{6\alpha}{\alpha-1}\right)^2 \cdot \left(1 + \frac{1}{k'}\right)^2 . \tag{2a}$$

Daraus wird bei $k' \to \infty$

$$n_{\text{Grenz}} = \left(\frac{6\alpha}{\alpha-1}\right)^2 \tag{6}$$

und

$$n' = n_{\text{Grenz}} \cdot \left(1 + \frac{1}{k'}\right)^2 . \tag{7}$$

Aus der von Golay für die Höhe eines theoretischen Bodens (H) [cm] angegebenen Formel berechnet sich Kurve c auf folgende Art:

$$H = \frac{2D_g}{u} + \left(\frac{1 + 6k' + 11k'^2}{24\,(1+k')^2} \cdot \frac{r^2}{D_g} + \frac{2k'}{3\,(1+k')^2} \cdot \frac{{d_{fl}}^2}{D_{fl}}\right) \cdot u . \tag{8}$$

D_g und D_{fl} [$cm^2 \cdot sec^{-1}$] stellen die Diffusionskoeffizienten der Probe in der gasförmigen bzw. flüssigen Phase dar. Das Trägergas strömt mit der linearen Geschwindigkeit u [$cm \cdot sec^{-1}$] durch eine Capillare mit dem Radius r [cm] und der Länge l [cm], die mit einer stationären Phase der Filmdicke d_{fl} [cm] benetzt ist. Für n gilt:

$$n = \frac{l}{H} . \tag{9}$$

Für die Berechnung wurden folgende Werte benutzt, die einesteils einer Arbeit von Desty u. Goldup[2] entstammen und anderenteils bei der Aufnahme der Kurve b gemessen wurden:

Temperatur: 60° C
d_{fl} : $0{,}33 \cdot 10^{-4}$ cm
l : $1{,}4 \cdot 10^{4}$ cm
u : 23,5 cm · sec^{-1}
r : $1{,}5 \cdot 10^{-2}$ cm

Substanz D	D_g	$D_{fl} \cdot 10^4$	k'	H	n
Methan	~0,15		(~0)	~0,01422	~985000
n-Butan	0,101	3,05	0,0683	0,01174	1190000
n-Pentan	0,0896	2,64	0,178	0,01273	1100000
n-Hexan	0,0815	2,35	0,462	0,01619	865000
n-Heptan	0,0754	2,13	1,176	0,02279	614000
n-Octan	0,0705	1,96	2,96	0,03000	467000
n-Nonan	0,0664	1,82	7,30	0,03705	378000

Kurven *b* und *c* erreichen bei $k' \to 0$ einen Grenzwert, während die erste bei $k' \to 0$ ins Unendliche steigt. Ein größerer Unterschied zwischen der experimentell erhaltenen und der von PURNELL für eine gleichbleibende Trennwirkung geforderten Bodenzahl tritt erst bei sehr kleinen Retentionszeiten auf.

In diesem Gebiet nimmt die Trennleistung der Kolonne ab, die man mit Hilfe von α^* beurteilen kann. α^* berechnet sich aus Gl. (2), falls man statt der zur Trennung notwendigen Bodenzahl n' die von der Kolonne gelieferte Bodenzahl n einsetzt. Ist n größer als n', so wird eine saubere Trennung erreicht. α^* ist in diesem Falle kleiner als α. Mit α^* wird das Verhältnis der red. Retentionszeiten (bzw. red. Retentions-Volumina) zweier zu trennender Substanzen bezeichnet, für welche die Kolonne gerade noch eine saubere Trennung gewährleistet. Aus den gegebenen Bodenzahlen n und den erhaltenen k'-Werten berechnen sich dann für die vorliegende Säule folgende Daten:

Substanz	n	t_R' (sec)	k'	α^*	n' (für $\alpha = 1{,}024$)*
n-Pentan	600000	105	0,175	1,055	3000000
n-Hexan	325000	275	0,458	1,033	655000
n-Heptan	190000	705	1,175	1,025	223000
	(65000)	(∞)	(∞)	1,024	65000

Bei *n*-Heptan liegt also kaum noch ein Unterschied zwischen den Trennleistungen, die durch die Kurven *a* und *b* gegeben sind, vor.

Durch geeignete Wahl von stehender Phase und Versuchstemperatur läßt es sich fast immer erreichen, daß man für jede zu trennende Probe in einem günstigen Bereich der n-k'-Kurve, das heißt im flachen Teil, arbeitet. Wie aber auch zu sehen ist, werden mit Capillarkolonnen in diesem Gebiet, bei reduzierten Retentionszeiten also, die größer als die Retentionszeit des Inertgases sind, ohne Schwierigkeit noch außerordentlich hohe Bodenzahlen erhalten. Unter diesen Bedingungen besteht dann kein wesentlicher Unterschied mehr zwischen Capillarkolonnen und gepackten Säulen in bezug auf den Aussagewert der Bodenzahlen. Abb. 3 zeigt zum Beispiel eine Trennung von p- und m-Xylol in nur 24 min mit einer durch Squalan benetzten Capillarkolonne. Das hat man mit der sehr universellen, aber für diese spezielle Trennung ungeeigneten Phase Squalan in gepackten Säulen noch nicht erreicht. Die theoretische Bodenzahl beträgt in diesem Beispiel 300000 für m-Xylol bei einem k' von 2,45.

Das kleine Verhältnis $t_R'/t_I = k'$ bei Capillarkolonnen bringt allerdings auch einen Vorteil. Mit diesen Säulen kann man bei niedrigeren Temperaturen arbeiten als mit gepackten Kolonnen, was vor allem für temperaturempfindliche Substanzen von Bedeutung ist. Es werden nämlich trotz der relativ kleinen k'-Werte, die ja für die Analysendauer verantwortlich sind, sehr gute Trennleistungen erzielt.

* Für $n_{Grenz} = 65000$ ergibt sich $\alpha = 1{,}024$.

Bei Zimmertemperatur, z.B. mit Squalan als stehender Phase, vermögen Capillarkolonnen trotz hoher Bodenzahlen nicht die niedrigen Kohlenwasserstoffe, wie etwa C_2-, C_3-, C_4-Paraffine und Olefine, voneinander zu trennen, obwohl sie ohne Schwierigkeit die Hexane, die Heptane und sogar fast alle Octane auftrennen können. Man muß also annehmen, daß ihre Trennleistungen für erst nach einiger Zeit aus der Kolonne austretende Substanzen größer sind als für die sehr früh erscheinenden. Die Bodenzahlen sind dagegen für Äthan, Propan und Butan wesentlich größer als für Heptan. Auch das wird natürlich durch das Verhältnis t_I/t_R' bedingt.

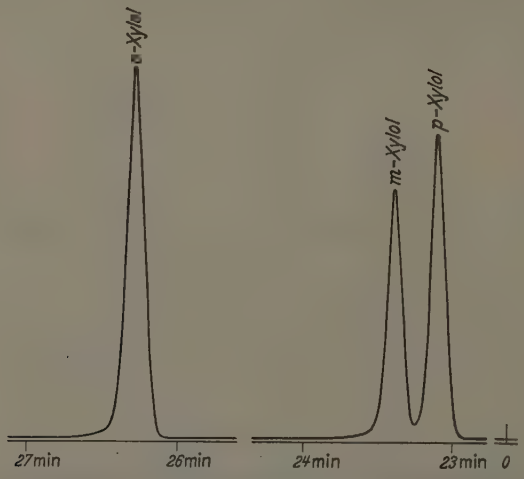


Abb. 3. p-m-o-Xylol-Trennung. Länge der Kolonne: 140 m; ⌀ 0,3 mm; gespült mit 10% Squalan; Trägergas: H_2; Eingangsdruck: 2,25 atü; lineare Strömungsgeschwindigkeit: 35 cm/sec; Temperatur: 80° C; Probemenge: 0,6 µg

Erhöht man bei einer Kolonne die Temperatur, so wachsen auch die Bodenzahlen, die Trennwirkung der Säule wird dagegen fast immer schlechter.

Wir versuchten daher, die Trennleistungen durch eine andere Maßzahl W zu charakterisieren. Wir bestimmten das Verhältnis von reduzierter Retentionszeit t_R' und Peakhalbwertsbreite σ'.

$$W = \frac{t_R'}{\sigma'} . \qquad (10)$$

Unter Peakhalbwertsbreite σ' wird die Breite des Zackens in 60,6% der Höhe verstanden. In dieser Höhe beträgt die Breite einer Gauß-Kurve die Hälfte der von den beiden Wendetangenten auf der Zeitachse heraus-

geschnittenen Zeitstrecke ω.

$$\sigma' = \frac{\omega}{2}. \tag{11}$$

Trägt man nun diesen empirischen *Trennwert W* bei einer Säule gegen die Temperatur auf, so scheint er die Trennleistung doch wesentlich besser wiederzugeben. Abb. 4 zeigt das Beispiel einer 140 m langen mit Squalan benetzten Capillarkolonne. Die Bodenzahlen nehmen fast alle stetig zu, die Trennwerte aber und auch die am Experiment festgestellte

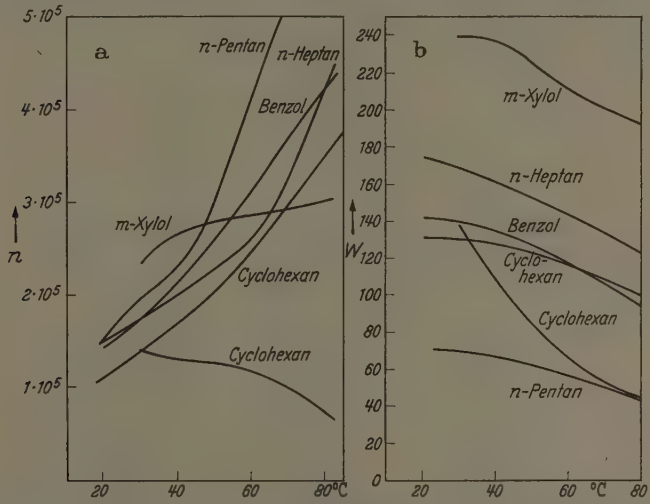


Abb. 4a u. b. Bodenzahlen und Trennwerte in Abhängigkeit von der Temperatur. Kolonne: Kupfer; Länge: 140 m; ⌀: 0,3 mm; stehende Phase: 0.33 μ Squalan; Trägergas: H_2; Strömungsgeschwindigkeit: 35 cm/sec

Trennleistung laufend ab. Ein weiteres Beispiel zeigt das nächste Bild (Abb. 5). Hier wurde die Kolonne versuchsweise mit einem zähen Schliffett belegt, und man sieht, wie es bei jeder Kolonne sein sollte, daß die Trennleistung bei einer bestimmten Temperatur ein Maximum erreicht. Wieder stellt man fest, daß die Bodenzahlen ansteigen, während die Trennwerte *W* durch ein Maximum laufen, das bei etwa 60° C liegt. Abb. 6 veranschaulicht an Diagrammen, die bei 20°, 30°, 40°, 50°, 60°, 80°, 100°, 120° und 140° C aufgenommen wurden, deutlich die Abhängigkeit der Trennleistung von der Temperatur. Unter den Kurven ist jeweils die 7. und 8. und zum Teil auch die letzte Minute der Analyse angegeben.

Weiterhin gibt aber der Trennwert auch den Gang der Trennleistung einer gegebenen Kolonne in Abhängigkeit von der reduzierten

Retentionszeit wieder. Abb. 7 zeigt, daß W von der reduzierten Retentionszeit 0 ab verhältnismäßig schnell mit etwa $t_R'^{0,5}$ ansteigt, um dann langsamer mit $t_R'^{<0,1}$ einem Grenzwert zuzustreben.

Durch Extrapolation dieser Kurve zu kleinen reduzierten Retentionszeiten sieht man, daß W bei Butan und Propan sehr klein wird. Man kann also kaum erwarten, daß Propan, Propen, die Butane und die Butene bei dieser vorliegenden Kolonne und bei diesen niedrigen Trennwerten sauber aufgespalten werden.

Führt man eine neue Größe ein, so fragt man natürlich, welche physikalische Bedeutung ihr zukommt. Zur Veranschaulichung kann man

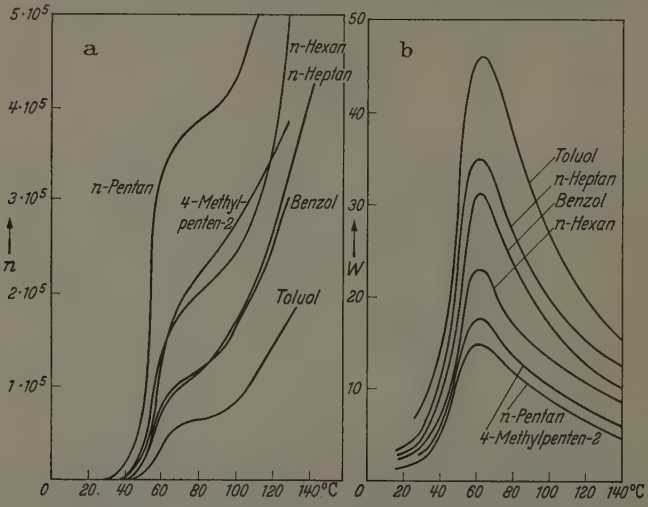


Abb. 5a u. b. Bodenzahlen und Trennwerte in Abhängigkeit von der Temperatur. Kolonne: Kupfer; Länge: 140 m; ⌀: 0,3 mm; stehende Phase: ~ 0,16 μ Hochvakuumfett mittels der Firma Pfeiffer, Wetzlar; Trägergas: H_2; Strömungsgeschwindigkeit: 35 cm/sec

sagen, daß W ungefähr die Anzahl der Peaks angibt, Dreiecksform vorausgesetzt, die bei der angegebenen reduzierten Retentionszeit gerade noch gut getrennt werden können, da man in erster Näherung annehmen kann, wie aus Abb. 8 hervorgeht, daß die Peakhalbwertsbreite σ' linear von der reduzierten Retentionszeit abhängt.

Es wäre dann:

$$\sigma' = f \cdot t_R' + c. \qquad (12)$$

f und c sind Konstanten. Unterteilt man nun die reduzierte Retentionszeit t_R' in kleine Teilstrecken von der Länge Δt, so gilt für die Anzahl der gerade noch sauber getrennten Zacken ΔW_a, die auf diese Strecke entfallen,

$$\frac{\Delta t}{2\sigma_{\Delta t'}} = \Delta W_a, \qquad (13)$$

falls man für $\sigma_{\Delta t}'$ das arithmetische Mittel aus den Halbwertsbreiten des ersten und des letzten der auf dieser Strecke liegenden Peaks annimmt,

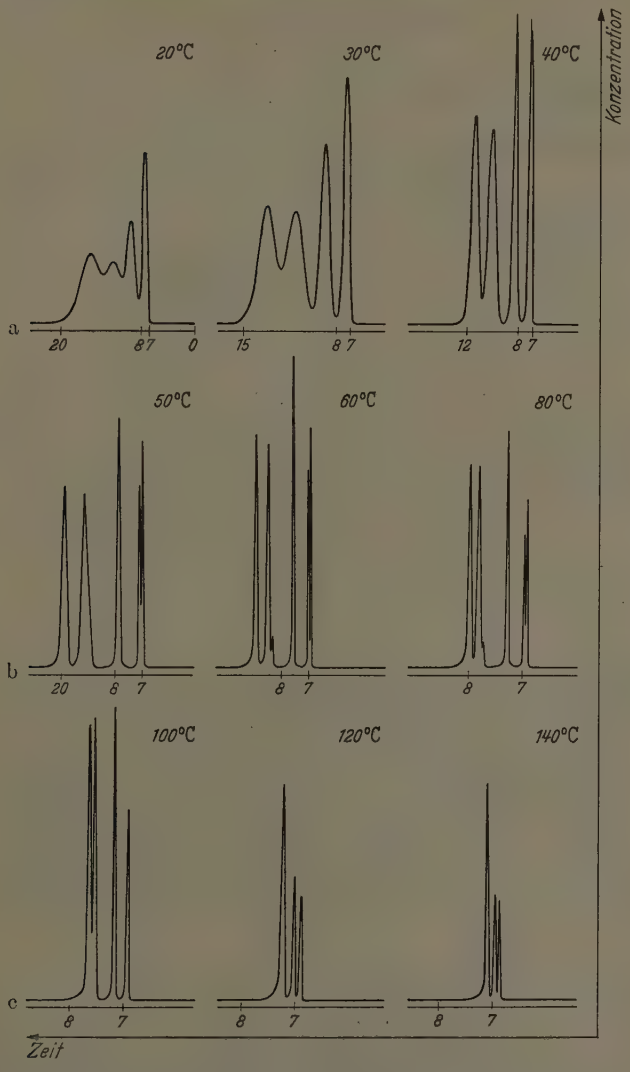


Abb. 6a—c. Trennwirkung in Abhängigkeit von der Temperatur. Diagramme der in Abb. 5 erwähnten Kolonne. Probe: i-Pentan, n-Pentan, n-Hexan, Benzol, Cyclohexan und n-Heptan

$$\sigma_{\Delta t} = \frac{(f \cdot t + c) + (f \cdot [t + \Delta t] + c)}{2} \tag{14}$$

$$\Delta W_s = \frac{1}{2} \cdot \frac{\Delta t}{f \cdot \left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) + c} \cdot \tag{15}$$

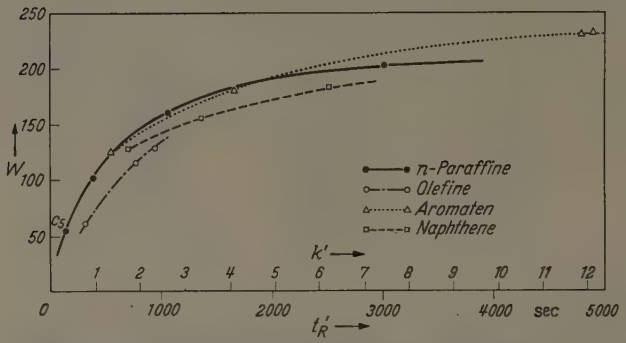


Abb. 7. Abhängigkeit des Trennwertes von der reduzierten Retentionszeit bzw. von k'. Kolonne: Kupfer; Länge: 140 m; ⌀: 0,3 mm; stehende Phase: 0,33 μ Squalan; Trägergas: H_2; Strömungsgeschwindigkeit: 35 cm/sec; Temp.: 40° C; Probemenge: ~ 0,1 μg je Komponente. t_I = 400 sec

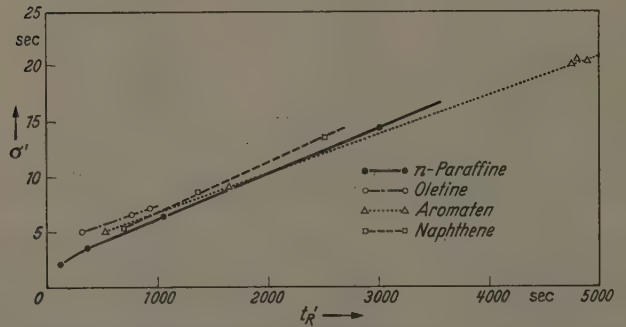


Abb. 8. Abhängigkeit der Peakhalbwertsbreite von der reduzierten Retentionszeit. Kolonne wie in Abb. 7

Die Summe sämtlicher Peaks von $t = 0$ bis $t = t_R'$ ist dann:

$$W_s = \frac{1}{2} \sum_{t=0}^{t=t_R'} \frac{\Delta t}{f \cdot \left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) + c} \cdot \tag{16}$$

Läßt man Δt verschwindend klein werden, so erhält man den genauen Wert für W_d:

$$W_d = \frac{1}{2} \int_{t=0}^{t-t_R'} \frac{dt}{f \cdot t + c} \tag{17}$$

$$W_d = \frac{1}{2f} \cdot \ln\left(1 + \frac{f \cdot t_R'}{c}\right). \tag{18}$$

Entwickelt man $\ln\left(1 + \frac{f \cdot t_R'}{c}\right)$ in Reihe und bricht nach dem ersten Glied ab, so kann man die angenäherte Übereinstimmung sehen:

$$W_d = \frac{1}{2f} \cdot 2 \left[\frac{\frac{f \cdot t_R'}{c}}{2 + \frac{f \cdot t_R'}{c}} + \frac{1}{3} \cdot \left(\frac{\frac{f \cdot t_R'}{c}}{2 + \frac{f \cdot t_R'}{c}} \right)^3 + \frac{1}{5} \cdot \ldots \right] \tag{19}$$

$$W_d \approx \frac{t_R'}{2c + f \cdot t_R'}. \tag{20}$$

Für den Trennwert W gilt dagegen [Gl. (10) und (12)]:

$$W = \frac{t_R'}{c + f \cdot t_R'}. \tag{21}$$

W_d stimmt mit W recht gut überein, falls $c < f \cdot t_R'$.

Eine exakte physikalische Deutung des Trennwertes W läßt sich mit Hilfe von Formel (2) geben. Nach dieser Gleichung müßte

$$N \equiv \left(\frac{2a\alpha^*}{\alpha^* - 1}\right)^2 = \frac{n}{\left(1 + \frac{t_I}{t_{R_2}'}\right)^2} \tag{22}*$$

N ein Maß für die Trennleistung sein, falls man für n' in Gleichung (2) die tatsächliche Bodenzahl n der Kolonne einsetzt. Je größer in Gl. (22) die rechte Seite ist, desto näher liegt α^* bei dem Grenzwert 1, das heißt, desto weniger brauchen sich die reduzierten Retentionszeiten zweier benachbarter Peaks zu unterscheiden. α^* wäre das für eine saubere Trennung noch zulässige Verhältnis der reduzierten Retentionszeiten zweier Komponenten bei der gegebenen Kolonne und bei der reduzierten Retentionszeit t_{R_2}' des zweiten Zackens. Man könnte N als „korrigierte Bodenzahl" bezeichnen. Entwickelt man Gl. (22) weiter, so erhält man unter Benutzung der Gl. (1), (5) und (11):

$$\frac{\sqrt{N}}{2a} = \frac{\alpha^*}{\alpha^* - 1} = \frac{2 \cdot \frac{t_{R_2}' + t_I}{\sigma'}}{2a \cdot \frac{t_{R_2}' + t_I}{t_{R_2}'}} = \frac{t_{R_2}'}{a \cdot \sigma'}. \tag{23}$$

* In Gl. 2 beträgt $a = 3$. a gibt die Entfernung zweier benachbarter Peakspitzen auf der Zeitachse an, ausgedrückt durch die Anzahl der Peakhalbwertsbreiten σ' der zweiten Komponente.

Nach Gl. (23) und (10) folgt aber:

$$\frac{\alpha^*}{\alpha^* - 1} = \frac{W}{a} \tag{24}$$

oder

$$N = 4\,W^2. \tag{25}$$

N, n, σ' und W müssen auf den zweiten Peak bezogen werden. α^* wäre nach Gl. (24):

$$\alpha^* = \frac{W}{W - a} \tag{26}$$

oder, was praktisch dasselbe ist:

$$\alpha^* \approx 1 + \frac{a}{W} = 1 + \frac{3}{W} \text{ bei } W > 20\,. \tag{27}$$

Gl. (27) zeigt, daß W ein direktes Maß für die Trennleistung einer Kolonne ist. Je größer W ist, desto mehr nähert sich α^* dem Wert 1. Trägt man

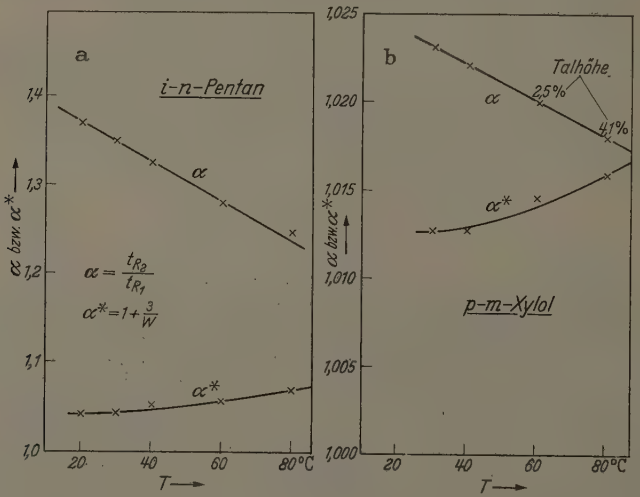


Abb. 9a u. b. Abhängigkeit der Trennung von dem Größenverhältnis von α und α*. Kolonne wie in Abb. 4

in einem Diagramm (Abb. 9) α^* und α zweier zu trennender Substanzen gegen die Temperatur auf, so ist sofort zu sehen, in welchem Bereich die Substanzen zu trennen sind. Sobald die α-Kurve unter die von α^* sinkt, kann man nicht mehr von einer sauberen Trennung sprechen. Unter einer sauberen Trennung wird hier verstanden, daß die Talhöhe zwischen zwei Zacken nicht wesentlich größer als 2,2% der Höhe des vorderen sein soll.

Dies ist die Höhe des Tales zwischen zwei gleich großen benachbarten Gauß-Kurven wenn, wie in Gl. (27), $a = 3$ und wenn $\alpha = \alpha^*$ ist. Die Talhöhe wurde auf den ersten Peak bezogen, da bei Zacken in der Gaschromatographie die Schwänze am Ende häufiger ausgeprägter sind als am Anfang und infolgedessen besonders der erste Zacken die Talhöhe bestimmt. Je größer die Schwänze zweier Zacken sind, desto höher ist das Tal zwischen zwei Peaks, auch schon wenn α^* kleiner als α ist. Für die meisten Zacken trifft es aber zu, daß es die quantitative analytische Auswertung der Kurvenflächen nicht stört, wenn man erst bei $\alpha = \alpha^*$ die Grenze für eine saubere Trennung ansetzt.

Bei normalen gaschromatographischen Peaks kann man annehmen, daß zwei Stoffe getrennt sind, wenn sie $3\,\sigma'$ (bei Dreieckzacken $2\,\sigma'$) auseinander liegen. In diesem Falle läge bei Gauß-Kurven eine saubere Trennung vor. Es müßte dann sein:

$$t_{R_2}' - t_{R_1}' = a' \cdot \sigma' \text{ mit } a' \geq 3. \tag{28}$$

σ' wird auf den ersten Peak bezogen. Durch entsprechende Umformung erhält man aus Gl. (10) und (28):

$$a' = W \cdot \frac{t_{R_2}' - t_{R_1}'}{t_{R_1}'}. \tag{29}$$

Oder

$$a' = W \cdot (\alpha - 1). \tag{30}$$

Wenn a' größer oder gleich 3 ist, kann man mit einer sauberen Trennung rechnen. Bei α kleiner oder gleich 1,2 ist es gleichgültig, ob man W auf den ersten oder zweiten Peak bezieht. In diesem Falle ist a' identisch mit dem weiter oben erwähnten a. Der Fehler beträgt dann höchstens 3%. In dem schon einmal aufgeführten Beispiel der p-m-Xyloltrennung ist $a' = a = 3{,}5$. Man sieht dort auch, daß bei einer etwas schlechteren Trennleistung der Kolonne die beiden Xylole nicht mehr aufgespalten würden.

a ist ein Maß dafür, wie weit zwei Peaks getrennt werden. Dagegen ist, wie man aus Gl. (27) ersehen kann, W ein direktes Maß für die Trennleistung der Kolonne in einem bestimmten k'-Bereich. Je größer W ist, desto weniger weicht α^* von 1, dem Wert für eine ideal gute Trennleistung, ab. Der Wert W erfüllt außerdem die Bedingung, daß er sehr einfach zu berechnen ist. Wie schon gezeigt wurde, läßt sich mit seiner Hilfe sehr schnell beurteilen, ob zwei Komponenten zu trennen sind, falls α (aus der Literatur) bekannt ist.

Die Trennleistung einer Kolonne ist unter anderem häufig auch von der Art der Substanz abhängig. Die eine Kolonne trennt (bei gleichem k') Olefine besser als Paraffine, während bei einer anderen das Umgekehrte der Fall ist. Gibt man daher irgendwelche Daten zur Charakterisierung

einer Kolonne an, so sollte man sie auf Standardsubstanzen, etwa die n-Paraffine, beziehen.

Betrachtet man k'-W-Kurven von verschiedenen Kolonnen, so scheint folgendes der Fall zu sein (Abb. 10; a, b, c von Capillarkolonnen, d, e, f von gepackten Säulen): Alle Kurven steigen bis etwa $k' = 3$ verhältnismäßig schnell an. Ab $k' = 8$ ändert sich der Trennwert nicht mehr wesentlich. Bei $k' = 1$ hat dieser etwa 50% seiner Maximalgröße erreicht*. Durch Angabe des Trennwertes bei $k' \approx 8$ dürfte daher im allgemeinen

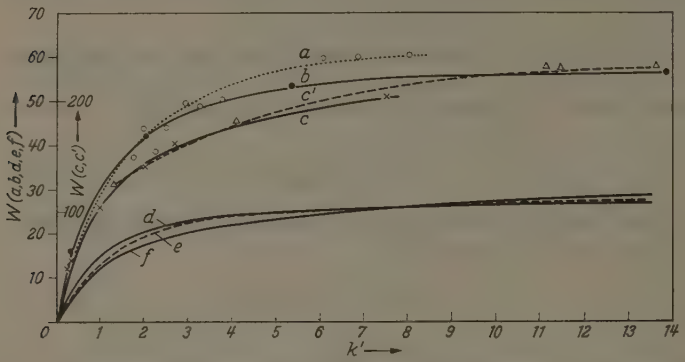


Abb. 10. Abhängigkeit des Trennwertes W von k' bei verschiedenen Kolonnen. a, b, c Capillarkolonnen (c Paraffine, c' Aromaten), d, e, f gepackte Säulen

die k'-W-Kurve innerhalb ihrer Streubreite festzulegen sein. Durch die gleichzeitige Angabe des k'-Wertes einer Standard-Substanz lassen sich dann fast alle Trennungen mit Hilfe der (zum Teil schon in der Literatur tabellierten) α-Werte abschätzen.

An dem nun noch aufgeführten Beispiel wird gezeigt wie die Daten einer Kolonne angegeben und wie die Trennwerte benutzt werden können.

Die Trennleistung der Kolonne, deren Trennwerte in Abb. 7 in Abhängigkeit von k' dargestellt sind, würde etwa auf folgende Art zu charakterisieren sein:

Trennwert 205 für n-Octan bei $k' = 7{,}4$.

Dann folgen die weiteren Kolonnendaten wie Temperatur, Trägergas, stehende Phase usw.

Es ist die Frage gestellt, ob p- und m-Xylol mit dieser Kolonne zu trennen sind.

Für die Trennung von p-m-Xylol an Squalan beträgt das Verhältnis der reduzierten Retentionszeiten (bzw. reduzierten Retentionsvolumina) bei 40° C $\alpha = 1{,}022$. Weiterhin findet man für das Verhältnis der reduzierten Retentionszeit von m-Xylol und n-Octan an Squalan bei 40° C 1,625. Daraus berechnet sich k' für m-Xylol zu $1{,}625 \cdot 7{,}4 = 12$. Aus einer skizzierten k'-W-Kurve (nach angegebenen k'-Werten: $k' = 0$, $W = 0$; $k' = 1$, $W \approx 105$; $k' = 7{,}4$, $W = 205$) läßt sich der

* Infolge der verhältnismäßig geringen Anzahl der bisher ausgewerteten Diagramme kann dieses Phänomen noch nicht verallgemeinert werden.

Trennwert von m-Xylol zu 210 abschätzen. Mit Hilfe von Gl. (27) berechnet sich α^* zu

$$\alpha^*_{\text{Xyl}} \approx 1 + \frac{3}{210} = 1{,}014.$$

Da α (1,022) größer als α^* (1,014) ist, sollten die beiden Xylole zu trennen sein, was sich auch durch das Experiment bestätigen ließ. Mit dieser Kolonne wurde ein Trennwert von $W = 235$ für m-Xylol gefunden. Aus W und α berechnet sich somit die Entfernung der beiden Xylol-Peaks zu 5,2 σ'.

$$a = W \cdot (\alpha - 1) \tag{30}$$
$$a = 5{,}2.$$

Verzeichnis der Symbole

a = Anzahl der Halbwertsbreiten σ', die zwei benachbarte Peakspitzen entfernt sind.
d_{fl}[cm] = Schichtdicke der stationären Phase.
D_{fl}[cm^{2}sec^{-1}] = Diffusionskoeffizient der Probe in der stationären Phase.
D_g[cm^{2}sec^{-1}] = Diffusionskoeffizient der Probe in der Gasphase.
H[cm] = Höhe eines theoretischen Bodens.
k = Verteilungskoeffizient: g Probe je cm^3 flüssiger Phase zu g Probe je cm^3 Gasphase.
k' = Verteilungskoeffizient, bezogen auf die Gesamtmengen gasförmiger bzw. flüssiger Phasen:

$$k' = k \cdot \frac{V_{fl}}{V_g}.$$

l[cm] = Länge der Capillarkolonne.
n = Theoretische Bodenzahl einer gegebenen Kolonne.
n' = Für eine bestimmte Trennung nötige theoretische Bodenzahl.
N = Korrigierte theoretische Bodenzahl einer gegebenen Kolonne.
r[cm] = Radius der Capillarkolonne.
t_R[cm] = Retentionszeit (siehe Abb. 1) der Probe.
t_I[sec] = Retentionszeit des Inertgases (siehe Abb. 1).
t_R'[sec] = Reduzierte Retentionszeit der Probe (siehe Abb. 1).
u[cm · sec^{-1}] = Lineare Strömungsgeschwindigkeit des Trägergases.
V_{fl}[cm^3] = Volumen der flüssigen, stehenden Phase.
V_g[cm^3] = Volumen der gasförmigen, bewegten Phase.
W = Trennwert.
W_a = Anzahl der Zacken bis $t = t_R'$ unter Voraussetzung der Dreiecksform und bei einer linearen Abhängigkeit des σ' von t_R'.
α = Relative reduzierte Retentionszeit bzw. relatives reduziertes Retentionsvolumen.
α^* = Grenzwert der relativen reduzierten Retentionszeit, um eine saubere Trennung bei einer gegebenen Kolonne zu erhalten.
$\alpha \geq \alpha^*$: Trennung zweier Komponenten.
σ'[sec] = Breite des Zackens in 60,6% der Höhe. Bei einer Gauß-Kurve ist das die Breite an den Wendepunkten und $\frac{\omega}{2}$.
ω[sec] = Die von den Wendetangenten eines Zackens auf der Zeitachse herausgeschnittene Zeitstrecke.

Zusammenfassung

An Hand von experimentellen und berechneten Daten von Capillarkolonnen wird die von Purnell abgeleitete Formel für die bei einer bestimmten Trennung nötige theoretische Bodenzahl diskutiert. Gleichzeitig wird der Begriff der theoretischen Bodenzahl selbst als grobe Maßzahl für die Trennleistung einer Kolonne angezweifelt. Es wird gezeigt, daß man mit Hilfe einer einfachen Größe, des Trennwertes, wesentlich besser die Trennleistung einer Kolonne charakterisieren und auch die Möglichkeit einer gewünschten Trennung abschätzen kann.

Literatur

[1] Ambrose, D., u. Mitarb., in: R. P. W. Scott: Gas-Chromatography 1960 (Edinburgh), preprint, Butterworths Sci. Publ., London 1960, S. 283. — [2] Desty, D. H., u. A. Goldup, in: R. P. W. Scott: Gas-Chromatography 1960 (Edinburgh), preprint, Butterworths Sci. Publ., London 1960, S. 202. — [3] Golay, M. J. E., in: D. H. Desty: Gas-Chromatography 1958, Butterworths Sci. Publ., London 1958, S. 36. — [4] Kaiser, R.: Gas-Chromatographie, Akad. Verlagsges. Geest und Portig K.G., Leipzig, 1960, S. 22, 31. — [5] Keulemans, A. I. M.: Gas-Chromatographie, übersetzt und mitbearbeitet von E. Cremer, Verlag Chemie GmbH., Weinheim/Bergstr. 1959, S. 105. — [6] Purnell, J. H.: Analyt. Chemistry **32**, 1268 (1960). — [7] Purnell, J. H.: Nature (London) **184**, 2009 (1959).

Dr. I. Halász u. G. Schreyer, Institut für Physikalische Chemie der Universität Frankfurt am Main, Robert Mayer-Straße 11

Flüssigkeitsbedecktes aktives Aluminiumoxyd als stationäre Phase in der Gaschromatographie

Von
I. Halász und E. E. Wegner

(Referat)

Als Trägermaterialien in der Gas-Flüssigkeits-Chromatographie haben sich heute hauptsächlich 1. Kieselgur (z. B. „Celite") und 2. gemahlene Brandziegel (z. B. „Sterchamol") durchgesetzt. Diese Träger verhalten sich im gaschromatographischen Versuch chemisch inert und inaktiv, was eine Gewähr dafür sein soll, daß man ein Chromatogramm mit symmetrischen Eluierzacken erhält. Diese häufig in der Literatur anzutreffende Behauptung kann jedoch nicht einfach verallgemeinert werden, denn auch mit einem flüssigkeitsimprägnierten aktiven Festkörper können symmetrische Eluierzacken unter gewissen Bedingungen erhalten werden. Ein aktiver polarer Träger wurde durch 7—10stündiges Ausglühen von γ-Aluminiumhydroxyd der Korngröße 0,1—0,15 mm bei 300° bzw. 400° C erhalten. Zur partiellen, aber selektiven Desaktivierung des aktiven Aluminiumoxydes wurden das unpolare Squalan und die polaren Flüssigkeiten Triäthylenglykol und β,β'-Oxydipropionitril ver-

wendet, deren Anteil an der aktiven stationären Phase 5—20 Gew.-% betrug. Auf Ausschluß der Luftfeuchtigkeit wurde geachtet. 20—150 μl eines gasförmigen Kohlenwasserstoffgemisches bis n-Butan oder n-Pentan wurde in Kolonnen von 2—3 m Länge und 4 mm lichter Weite zwischen 0° und 20°C getrennt; die Trägergasgeschwindigkeit (H_2) betrug 50—75 ml/min. In allen Versuchen gehen die Wirkungen von einem Festkörper-Flüssigkeitssystem aus, die Eigenschaften der Einzelkomponenten überlagern sich. Betrachten wir die Polarität des Systems, hier gleichbedeutend mit dem auf Propan (= 1) bezogenen relativen Retentionsvolumen von Propan oder der nach E. Bayer definierten Selektivität des Substanzpaares Olefine-Paraffine: Wachsende Squalanmengen auf dem Al_2O_3 setzen die Selektivität Olefine-Paraffine kontinuierlich herab. Bei Zugabe des polaren β,β'-Oxydipropionitrils oder Triäthylenglykols geht die Selektivität oder Polarität durch ein Minimum und steigt bei höherem Flüssigkeitsgehalt auf dem Aluminiumoxyd wieder an. Die Polaritäten der Flüssigkeit und des Festkörpers für sich betrachtet, sind größer als der Wert des Minimums, was für eine chemische Reaktion der polaren Flüssigkeiten mit dem Al_2O_3 unter Kompensation beider Polaritäten spricht[1]. — Durch ansteigende Flüssigkeitsmengen werden die Retentionsvolumina kontinuierlich herabgesetzt, und zwar bei Zugabe polarer Flüssigkeiten schneller als bei Zugabe von Squalan.

Für die analytische Anwendung einige Beispiele: Bei 400°C geglühtes Al_2O_3, das mit 7,5% Squalen bedeckt wurde, trennte ein Kohlenwasserstoffgemisch bis n-Butan in etwa 15 min völlig auf, d.h. auch Luft-Methan und Äthan-Äthylen. Die Zahl der theoretischen Böden, gemessen an n-Butan, betrug 3600 und die daraus berechnete HETP 0,55 mm, d.h. diese 2 m-Kolonne mit aktivem Trägermaterial ist etwa 5—10mal wirksamer als eine mit inaktivem Träger gefüllte unter gleichen Bedingungen arbeitende Kolonne, weshalb es möglich ist, mit kurzen Kolonnen auszukommen. — Ein Zusatz von 17 Gew.-% β,β'-Oxydipropionitril zu einem bei 400°C aktivierten Aluminiumoxyd setzt dessen Aktivität stark herab (kurze Analysenzeiten!), läßt sie jedoch nicht verschwinden, da bei einem mit β,β'-Oxydipropionitril benetzten inaktiven Träger die Kohlenwasserstoffgase so schnell hintereinander durchbrechen würden, daß keine Trennung mehr erzielt werden würde. Die Polarität ($V'_{RC_3H_6}/V'_{RC_3H_8} = 1{,}9$) dieser stationären Phase (Al_2O_3 + Flüssigkeit) ist so hoch, daß man mit einer 3 m langen Kolonne bei 15°C in 9 min 12 aliphatische und olefinische Kohlenwasserstoffe vom Methan bis einschließlich der Butene und des 1,3-Butadiens vollständig trennen kann (bis cis-Buten-2 = 6 min). Arbeitet man bei 0°C, so kommt man schon mit einer 2 m langen Kolonne aus[1]. Enthält das Kohlenwasserstoffgemisch auch i- und n-Pentan, so muß man die Kolonne verlängern, die Polarität der stationären Phase oder die Versuchstemperatur senken, bzw. mehrerer dieser Maßnahmen kombinieren, wenn man verhindern will, daß die Butenpeaks und diejenigen der C_5-Kohlenwasserstoffe einander überlappen. Das geht auf Kosten der Analysenzeit ($\leq$ 20 min). — Die Reproduzierbarkeit der Messungen ist gut; eine aktive Kolonne mindestens 6 Wochen brauchbar.

Dr. I. Halász und E. E. Wegner, Institut für Physikalische Chemie der Universität, Frankfurt am Main, Robert Mayer-Straße 11

[1] Vgl. I. Halász u. E. E. Wegner, Nature (London) **189**, 570 (1961).

Aufbau und Arbeitsweise eines Capillarchromatographiegerätes mit Flammenionisationsdetektor für quantitative Analysen diskutieren I. Halász und G. Schreyer[1]. Zuerst werden Probleme untersucht, die bei dem Aufbau eines geeigneten Systems auftreten. Hierbei werden besonders Probeaufgabesystem und die Wahl des Verstärkers besprochen. — Vor allem werden die günstigen Arbeitsbedingungen eines Flammenionisationsdetektors aufgezeigt, besonders die Abhängigkeit des Null-Stromes und der Ansprechempfindlichkeit des Detektors bei verschiedenen Trägergas- und Wasserstoffströmungsgeschwindigkeiten. — Es wird der Einfluß der Temperatur, des Druckes und der Schichtdicke auf die Trennwirkung der Kolonnen nach eigenen Experimenten diskutiert. — Schließlich wird über die Bedingungen der quantitativen Analyse mit diesem System an Hand eigener Experimente gesprochen.

Institut für Organische Chemie der Technischen Hochschule Karlsruhe

Präparative Gaschromatographie

II. Mitteilung*

Von

Ernst Bayer, Gerd Wahl und Heinz Günther Witsch

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 2. Januar 1961)

Die präparative Gaschromatographie ist eine wünschenswerte methodische Bereicherung im Laboratorium eines mit organischen Substanzen arbeitenden Chemikers. In vielen Fällen kann die Gaschromatographie mit der Destillation in Konkurrenz treten. Denn einmal ist, besonders bei Verwendung sehr selektiver Phasen die Trennwirksamkeit mit Gaschromatographie wesentlich größer und zum anderen ist die Trennung auch auf kompliziertere Substanzgemische mit fünf und mehr Komponenten ähnlichen Siedepunktes ausdehnbar. Bekanntlich sind letztere Trennungen destillativ kaum zu verwirklichen. Wir sehen einen weiteren Vorteil der präparativen Gaschromatographie darin, daß man mit der analytischen Gaschromatographie vorher mit geringen Substanzmengen die Trennmöglichkeit und die Trennbedingungen eindeutig festlegen und dann in den größeren Maßstab übertragen kann.

Es stehen grundsätzlich zwei Wege zur Ausdehnung der präparativen Gaschromatographie in den Bereich größerer Substanzmengen zur Verfügung. Das ist einmal die Verwendung sehr selektiver Phasen, an denen sich die Retentionsvolumina ähnlich oder gleich siedender Sub-

---

[1] Institut für Physikalische Chemie, Universität Frankfurt (Main), Robert Mayer-Straße 11. (Der Vortrag wurde nicht gehalten.)

* I. Mitteilung: E. Bayer u. H. G. Witsch, diese Z. **170**, 278 (1959).

stanzen stark unterscheiden. Wenn die Retentionsvolumina weit auseinanderliegen, kann die Säule auch überladen, d.h. mit größeren Substanzmengen belastet werden und trotzdem noch eine Trennung erreicht werden. Der andere Weg zur präparativen Gaschromatographie ist durch eine Vergrößerung des Säulenquerschnittes zu erreichen. Im folgenden werden für beide Wege Beispiele angegeben.

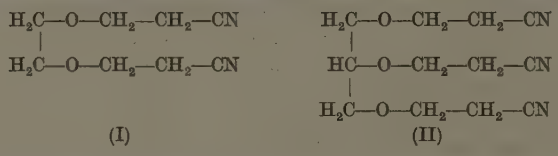
Der genaue Aufbau des präparativen Gaschromatographen mit Säulendurchmessern bis zu 10 cm und vollautomatisch arbeitendem Fraktionssammler ist an anderer Stelle beschrieben[2] und auf die einzelnen Konstruktionsmerkmale eingehend hingewiesen worden. Für die anderen, hier geschilderten Trennungen fand der Gaschromatograph der Fa. Rubarth u. Co. Verwendung (vgl.[3]).

Mengenmäßige Trennung mit selektiven Trennflüssigkeiten

Unter allen in der Gaschromatographie bisher benutzten Trennflüssigkeiten nimmt der β,β'-Bis(propionitril)-äther eine besondere Stellung ein[1,5,7]. Diese Substanz dürfte die am selektivsten wirkende, bisher aufgefundene Trennflüssigkeit sein. Die Anwendung des Bis(propionitril)-äthers ist lediglich durch seinen hohen Dampfdruck auf eine maximale Arbeitstemperatur von 70°C begrenzt. Für Substanzen mit höheren Siedepunkten als 100—120°C kann deshalb diese Verbindung keine Verwendung finden. Wir haben daher zunächst nach neuen Trennflüssigkeiten gesucht, die ähnlich selektiv wie β,β'-Bis(propionitril)-äther sind, aber bei höheren Temperaturen Verwendung finden können. Wir sind bei der Suche nach solchen Trennflüssigkeiten von der Voraussetzung ausgegangen, daß die Selektivität des Propionitriläthers von der gleichzeitigen Anwesenheit des Äthersauerstoffes und der Nitrilgruppen bedingt wird. Es wäre nun prinzipiell möglich gewesen, zu höheren Homologen des Bis(propionitril)-äthers überzugehen, z.B. zum Bis(butyronitril)-äther, die einen höheren Siedepunkt aufweisen und damit eine höhere Arbeitstemperatur ermöglichen. Da bei Äthern jedoch mit größerer werdendem Gehalt an Alkylgruppen sowohl das permanente Diplomoment als auch die Polarisierbarkeit abnehmen, wäre für solche Verbindungen wohl auch eine geringere Selektivität zu erwarten. Wir sind deshalb zu Propionitriläthern übergegangen, bei denen die als wirksam angesehenen Äthersauerstoffe und die Nitrilgruppen nicht durch eine größere aliphatische Kette getrennt sind. Durch Anlagerung von Acrylnitril an Polyalkohole erhält man nun Trennflüssigkeiten, die sowohl hinsichtlich ihrer Selektivität als auch ihrer maximalen Arbeitstemperaturen den Erwartungen entsprechen.

Eingehender untersucht worden sind Äthylenglykol-bis(propionitril), äther [I] und Glycerin-tri(propionitril)-äther [II], welche nach Nazarow-Schwechgeimer u. Rudenko[6] bzw. Bruson u. Riener[4] synthetisiert

werden können. Substanz [I] kann bis zu einer maximalen Arbeitstemperatur von 140°C und Substanz [II] bis 170°C auch über längere



(I) (II)

Zeiträume hinaus benutzt werden. Neben der Anwendung bei präparativen Trennproblemen wird nach unserer Meinung diese selektive Phase auch insbesondere bei der Capillar-Gaschromatographie und als Trennflüssigkeit in Betriebs-Gaschromatographen Verwendung finden können,

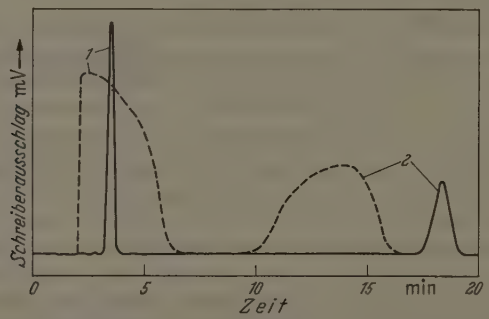


Abb. 1. Trennung von Cyclohexan (*1*) und Benzol (*2*) an einer 6 m-Säule (0,6 cm ⌀) mit 20% Äthylenglykol-bis(propionitril)-äther auf Sterchamol (0,2—0,3 mm ⌀). *Analytische Menge* (——): 0,008 ml Probenmenge, *T* 60°C, H_2-Durchfluß 45 ml/min, Empfindlichkeit 5 mV. *Präparative Menge* (— — —): 2,0 ml Probenmenge, *T* 80°C, H_2-Durchfluß 80 ml/min, Empfindlichkeit 100 mV

wo β,β'-Bis(propionitril)-äther auf Grund seiner hohen Flüchtigkeit zu Schwierigkeiten Anlaß geben kann. Es ist anzunehmen, daß die Substanzen [I] und [II] allgemein β,β'-Bis(propionitril)-äther bei der analytischen Gaschromatographie ersetzen können.

Über die Selektivitätseigenschaften der neuen Trennflüssigkeiten wird an anderer Stelle berichtet werden. Hier sei nur am Beispiel eines gleichsiedenden Substanzpaares, nämlich Cyclohexan (KP 80,8°C) und Benzol (KP 80,1°C) gezeigt, mit wieviel zu trennender Substanz eine solche selektive Trennflüssigkeit überladen werden kann, ohne daß eine Überlagerung der einzelnen Banden auftritt. Sofern unter solchen „Überladungsbedingungen" präparativ gaschromatographiert wird, muß unbedingt darauf geachtet werden, daß die Trenntemperatur nicht unterhalb der Siedepunkte der zu trennenden Verbindungen liegt, da sonst Kondensationen zum unliebsamen Auswaschen der stationären Flüssigkeit führen könnten.

In Abb. 1 ist ein analytisches Gaschromatogramm von 0,008 ml einer Mischung Benzol : Cyclohexan (1 : 1 vol/vol) an einer analytischen Säule von 0,6 cm Durchmesser wiedergegeben. Die Retentionsvolumina der beiden gleichsiedenden Substanzen unterscheiden sich um den Faktor 6. Entsprechend diesem großen Unterschied lassen sich selbst bei der analytischen Trennsäule noch 2 ml des Benzol-Cyclohexangemisches trennen, ohne daß es zu einer Überschneidung der Banden kommt.

Die Anwendung solcher hochselektiver stationärer Flüssigkeiten empfiehlt sich vor allem dann, wenn das zu trennende Substanzgemisch nicht zu komplex zusammengesetzt ist. Abb. 2 zeigt ein weiteres typisches Trennungsbeispiel, die Trennung von 1,2,3,4-Tetrahydronaphthalin (KP 206,6°C) und 1,2,3,4,5,8-Hexahydronaphthalin (KP 204,5°C). Diese beiden Substanzen konnten an wenig selektiven Phasen wie Dinonylphthalat nicht aufgetrennt werden. An Äthylenglykol-bis(propionitril)-äther liegen jedoch die Retentionsvolumina genügend weit auseinander,

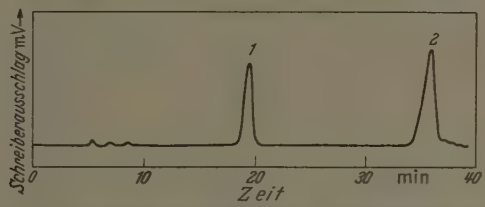


Abb. 2. Trennung von 1,2,3,4,5,8-Hexahydronaphthalin (*1*) und 1,2,3,4-Tetrahydronaphthalin (*2*) an einer 6 m-Säule mit 20% Äthylenglykol-bis(propionitril)-äther auf Sterchamol (0,2—0,3 mm ⌀). *T* 140°C. H_2-Durchfluß 65 ml/min

so daß hier auch eine Trennung größerer Mengen möglich ist. Dieses Beispiel zeigt gleichzeitig auf, daß nunmehr auch eine selektive Trennflüssigkeit für höhersiedende Verbindungen zur Verfügung steht.

Trennung an Säulen größeren Durchmessers

Bei Substanzgemischen mit mehr als fünf Komponenten ist nach unseren Erfahrungen die präparative Trennung mittels selektiver Flüssigkeiten in Säulen kleinen Querschnittes schwer möglich. Die Retentionsvolumina der einzelnen Substanzen liegen nämlich auch dann sehr nahe beieinander, so daß man keine wesentliche Bandenverbreiterung in Kauf nehmen kann ohne eine Überlagerung der Banden zu erhalten. Eine mengenmäßige Trennung komplizierter Substanzgemische kommt deshalb nur an Säulen größeren Durchmessers in Frage.

Zur Beurteilung der Leistung einer präparativen Säule größeren Querschnittes sollten jeweils zwei Größen dienen, die für jede Säule ermittelt werden sollten. Eine wesentliche Größe ist die *Trennwirksamkeit* bei optimalem Durchfluß an Trägergas die, wie üblich, durch die „Theoretische Bodenhöhe" (HETP) ausgedrückt wird. Außerdem

interessiert bei präparativen Säulen die Menge Substanz, welche getrennt werden kann, ohne daß es zu einer Bandenverbreiterung kommt. Diese von uns als *Belastbarkeit* bezeichnete Größe hängt von der Löslichkeit der zu trennenden Substanzen in der jeweilig verwandten stationären Flüssigkeit ab und ist damit von Trennproblem zu Trennproblem verschieden. Es ist vor allem interessant, ob bei Säulen größeren Durchmessers die gleichen Mengen Substanz, bezogen auf die Flächeneinheit des Querschnittes, getrennt werden können wie bei analytischen Säulen. Aber auch eine Angabe der maximal trennbaren Substanzmenge ist

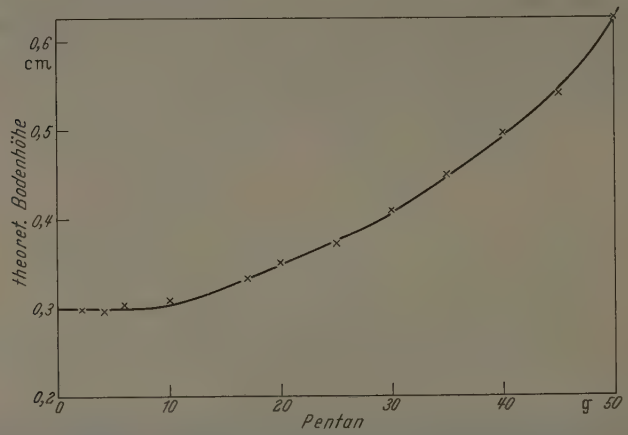


Abb. 3. Abhängigkeit der Bodenhöhe von der eingegebenen Menge Pentan. 2 m-Säule (10,1 cm ⌀) mit 20% Dinonylphthalat auf Sterchamol (0,2—0,3 mm ⌀). Trägergasdurchfluß 9,0 l H_2/min. T 20° C

erwünscht. Da die Belastbarkeit einer Säule von dem Verteilungskoeffizienten abhängt und damit bei jeder zu trennenden Substanz und jeder Trennflüssigkeit unterschiedlich ist, können keine absoluten, allgemeingültigen Werte erhalten werden. Die Größenordnung der Belastbarkeit kann jedoch erfaßt werden, wenn eine Substanz und Trennflüssigkeit gewählt werden, die einen mittleren Verteilungskoeffizienten aufweisen. Wir haben deshalb Dinonylphthalat als Trennflüssigkeit und n-Pentan als zu chromatographierende Verbindung gewählt. Die Belastbarkeit wird jeweilig nur für eine einzelne Substanz angegeben und ist somit nicht identisch mit der maximalen Menge, die man von einem Mehrkomponentengemisch chromatographieren kann. Sofern ein Mehrkomponentengemisch mit gleicher Konzentration an Einzelkomponenten vorliegt, würde man die maximal chromatographierbare Menge durch Multiplikation der Belastbarkeit mit der Zahl der Einzelkomponenten erhalten.

An 2m-Säulen von 1—10,1 cm Durchmesser sind nun jeweilig steigende Mengen Pentan chromatographiert worden. Abb. 3 zeigt die so erhaltene Abhängigkeit zwischen der Bodenhöhe und der aufgegebenen Menge Pentan für eine Säule von 10,1 cm Durchmesser.

Eine Überladung tritt an dieser Säule erst ab etwa 10 g Pentan auf, wie sich an dem steileren Anstieg der Bodenhöhe ab diesem Wert zu erkennen gibt. Solche Kurven sind nun für die Säulen verschiedenen Durchmessers aufgenommen worden. Als Belastbarkeit wird die Menge Pentan angesehen, bei der noch keine wesentliche Bandenverbreiterung auftritt, d.h. der Punkt in der Kurve (Abb. 3), bei dem der steile Anstieg beginnt. In der Tabelle sind die auf diese Weise erhaltenen Trennwirksamkeiten, Belastbarkeiten, und Belastbarkeiten je Querschnitt für die

Tabelle. *Trennwirksamkeit und Belastbarkeit präparativer Säulen*
(Stationäre Phase wie bei Abb. 3. Chromatographierte Substanz: Pentan)

Säulendurchmesser cm	1	1,77	2,79	4,1	10,1
Säulenquerschnitt cm^2	0,75	2,4	6,2	13,2	80,0
Theoretische Bodenhöhe mm	2,0	2,2	2,6	2,9	3,0
Belastbarkeit g Pentan	0,1	0,32	0,80	1,4	9,5
Belastbarkeit je 0,1 cm^2 mg Pentan/0,1 cm^2	14	13	13	11	11

Säulen von 1—10 cm Durchmesser angegeben. Es geht eindeutig hervor, daß die Trennwirksamkeit der präparativen Säulen mit Bodenhöhen von 2—3,5 mm in der gleichen Größenordnung liegen wie bei analytischen Säulen (Bodenhöhen von 1—3 mm). Außerdem ist den Angaben in der Tabelle zu entnehmen, daß die Belastbarkeit der Säulen proportional dem zunehmenden Querschnitt ansteigt. Auf diesen Punkt möchten wir ganz besonders hinweisen. Denn es ist in jüngerer Zeit der Eindruck erweckt worden, als ob die Säulen größeren Durchmessers bezüglich ihrer Belastbarkeit je Querschnitt den analytischen Säulen unterlegen wären*.

Durch diese Messung wird eindeutig festgelegt, daß eine präparative Auftrennung an Säulen größeren Durchmessers sowohl bezüglich der Menge an zu trennender Substanz als auch bezüglich der Trennwirksamkeit befriedigend verläuft. Es ist allerdings notwendig gewesen, eine ganze Reihe apparativer und konstruktiver Einzelheiten vor dem Aufbau des präparativen Gaschromatographen experimentell zu klären. Über diese

* Diese irreführenden Angaben sind in einem Referat über das 3. Internationale Symposium über Gaschromatographie in Edinburgh, Juni 1960 [Angew. Chem. 72, 527 (1960)] enthalten, obgleich dem Referenten sicher nicht entgangen sein konnte, daß schon E. Bayer in Edinburgh ausdrücklich darauf hingewiesen hat, daß an 10 cm-Säulen 10 g Pentan ohne Bandenverbreiterung eingegeben werden können und bei der Trennung Pentan/Isopentan sogar 40 ml des Gemisches aufgetrennt werden können.

Untersuchungen wird im Zusammenhang mit der Beschreibung des präparativen Gaschromatographen berichtet[2].

Dem Fonds der Chemischen Industrie und der Badischen Anilin- und Sodafabrik danken wir bestens für die Unterstützung unserer Arbeiten.

Zusammenfassung

Es werden zwei neue, sehr selektive Trennflüssigkeiten, Äthylenglykol-bis(propionitril)-äther und Glycerin-tri(propionitril)-äther, angegeben. Die Trennflüssigkeiten sind so selektiv wie β,β'-Bis(propionitril)-äther, erlauben aber höhere Arbeitstemperaturen von 140° bzw. 170°C. An Säulen kleinen Querschnittes wird die präparative Trennung größerer Mengen unter Ausnutzung der Selektivität dieser Trennflüssigkeiten aufgezeigt.

Die Trennwirksamkeit und die Belastbarkeit von Säulen verschiedenen Durchmessers zwischen 1—10 cm wird angegeben. Die Trennwirksamkeit liegt in der gleichen Größenordnung wie die der analytischen Säulen. Die Belastbarkeit steigt proportional dem Querschnitt an.

Literatur

[1] Bayer, E.: Angew. Chem. **71**, 299 (1959); vgl. diese Z. **173**, 150 (1960). — [2] Bayer, E., K. Hupe u. H. G. Witsch: Angew. Chem., im Druck. — [3] Bayer, E., u. H. G. Witsch: Diese Z. **170**, 278 (1959). — [4] Bruson, H. A., u. T. W. Riener: J. Amer. chem. Soc. **65**, 23 (1943). — [5] Kelker, H.: Angew. Chem. **71**, 218 (1959); vgl. diese Z. **172**, 198 (1960). — [6] Nazarow, J. N., G. A. Schwechgeimer u. W. A. Rudenko: Ž. obšč. Chim. **24**, (86), 329 (1954); vgl. Chem. Zbl. **127**, 12808 (1956). — [7] Tenney, H. M.: Analyt. Chemistry **30**, 2 (1958); vgl. diese Z. **164**, 413 (1958).

Dozent Dr. Ernst Bayer,
Karlsruhe, Englerstr. 11, Institut für Organische Chem. Technische Hochschule

---

Reichhold Chemie AG. Hamburg-Wandsbek

Anwendungsbeispiele der Gaschromatographie in der industriellen Praxis

Von
G. Schulz

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 28. Oktober 1960)

I. Trennung und quantitative Bestimmung von Inden, Naphthalin, Thionaphthen, α- und β-Methylnaphthalin durch Gaschromatographie

Wir hatten uns im Rohstofflabor unseres Hauses die Aufgabe gestellt, durch möglichst einfache Mittel die Verunreinigungen im Rohnaphthalin, das zur Phthalsäureanhydridherstellung verwendet wird, zu

bestimmen. Um eine Vergiftung des Katalysators zu vermeiden, soll das Rohnaphthalin einen möglichst geringen Gehalt an Thionaphthen haben. Bislang war es üblich, den Thionaphthengehalt durch eine Schwefelbestimmung zu überprüfen, wie dies z.B. nach GROTE-KREKELER durch Verbrennung der schwefelhaltigen Substanz im Luftstrom möglich ist. Wir haben mit Erfolg versucht, hier gaschromatographische Methoden anzuwenden. Dies ist zudem noch mit dem Vorteil verbunden, auch die anderen Verunreinigungen, die im Rohnaphthalin vorhanden sind, bestimmen zu können.

Für die Durchführung unserer Versuche benutzten wir einen Gaschromatographen der Fa. Perkin Elmer, das Fraktometer 116. Als Detektor wurde eine Hitzdrahtwärmeleitfähigkeitsmeßzelle verwendet.

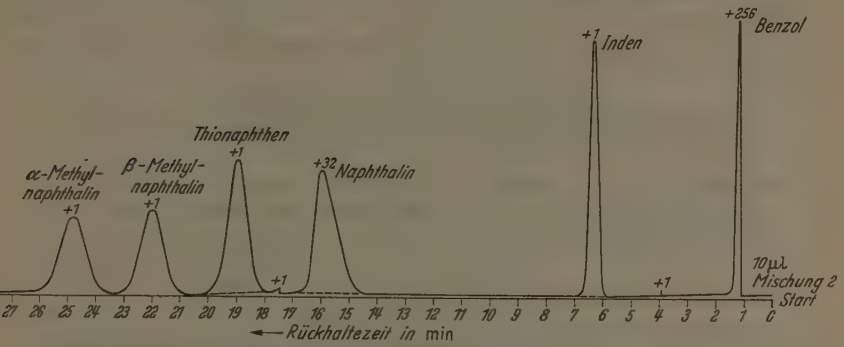


Abb. 1. Chromatogramm einer Mischung aus 92% Naphthalin und je 2% Inden, Thionaphthen, β- und α-Methylnaphthalin. *Arbeitsbedingungen:* Temperatur: 190° C; Trägergas: Helium; Druck: 2 atü; Strömung: 70 ml/min; Empfindlichkeit des Hitzdrahtdetektors: 5; Säule: K; Länge: 3 m (Polyäthylenglykol)

Das Rohnaphthalin enthält außer dem Thionaphthen noch Inden, α-Methylnaphthalin und β-Methylnaphthalin. Die Siedepunkte betragen bei Inden 182,2,° bei Naphthalin 217,9°, bei Thionaphthen 221°, bei β-Methylnaphthalin 241° und bei α-Methylnaphthalin 244,2° C. Die Trennung Inden/Naphthalin macht keine Schwierigkeiten. Dagegen ist die Trennung Naphthalin/Thionaphthen bedeutend schwieriger durchzuführen. Bei der Suche nach einer geeigneten flüssigen Phase stellten wir fest, daß Siliconöle, Di-decylphthalat, Polypropylenglykol und Apiezonfett keine oder nur eine sehr schlechte Trennung ergeben. Polyäthylenglykol, Molekulargewicht 1500, als flüssige Phase, ermöglichte dagegen eine gute Trennung von Naphthalin/Thionaphthen und auch von β-Methylnaphthalin/α-Methylnaphthalin.

Wir verwendeten die K-Säule der Fa. Perkin Elmer in einer Länge von 3 m. Das Trägermaterial ist Kieselgur, Trägergas ist bei sämtlichen Versuchen Helium. Da Naphthalin bei Zimmertemperatur fest ist, verwendeten wir als Lösungsmittel

Benzol p.a. der Fa. Merck. Wir wählten eine Einspritzmenge von 10 μl einer 30%igen Naphthalinlösung. Die Temperatur beträgt bei dieser Analyse 190° C.

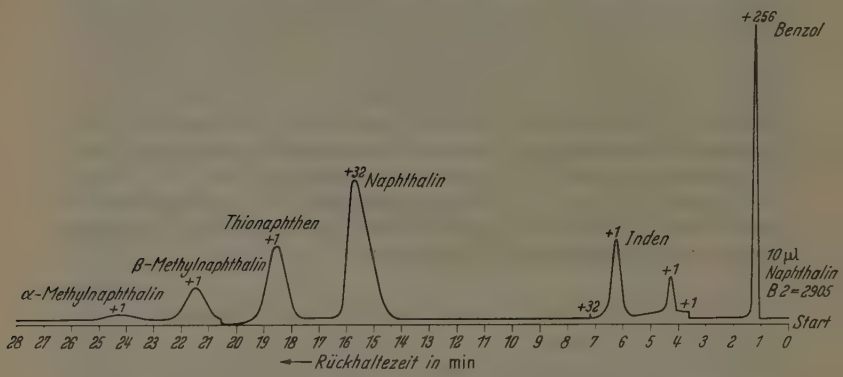


Abb. 2. Chromatogramm eines Rohnaphthalins vom Erstarrungspunkt 78,5° C. *Arbeitsbedingungen:* Trägergas: Helium; Druck: 2 atü; Strömung: 70 ml/min; Empfindlichkeit: 5; Säule: K; Länge: 3 m

Wir führten Versuche durch mit je 4, 2, 1 und 0,5% Verunreinigungen. Abb. 1 zeigt die Verunreinigungen, wie sie zu je 2% vorhanden sind. Die Trennung ist ausreichend. Die Analyse dauert etwa 30 min.

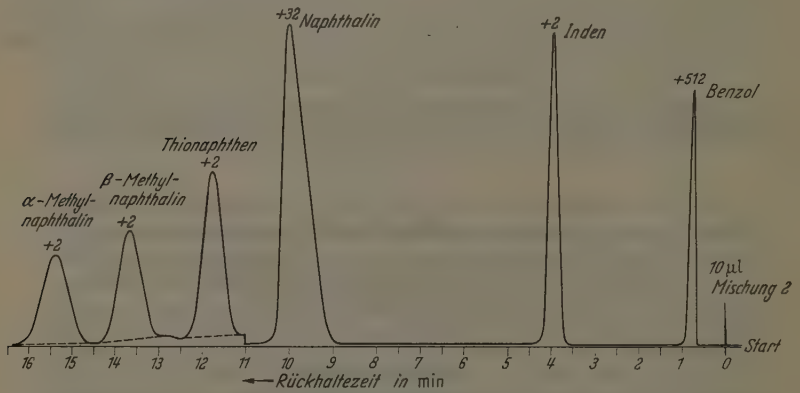


Abb. 3. Mischung wie Abb. 1, jedoch folgende *Arbeitsbedingungen:* Temperatur: 190° C; Trägergas: Helium; Druck: 1,4 atü; Strömung: 70 ml/min; Empfindlichkeit: 5; Säule: K; Länge: 2 m (Polyäthylenglykol)

Es erschien uns wissenswert zu erfahren, ob bei dem Rohnaphthalin, wie es üblicherweise verwendet wird, noch bisher unbekannte Verunreinigungen in größerer Menge vorhanden sind. Dies war nicht der Fall. Abb. 2 zeigt Rohnaphthalin mit dem Erstarrungspunkt von 78,5° C. Bei

der quantitativen Auswertung haben wir durch mehrere Versuche festgestellt, daß die Flächenprozente, die wir durch Planimetrieren gefunden haben, praktisch gleich den Gewichtsprozenten sind, so daß keine Umrechnungsfaktoren benötigt werden. Das Naphthalin mit einem Erstarrungspunkt von 78,5° C enthält 96,9% Naphthalin, 1,35% Thionaphthen — das würde einem Schwefelgehalt von 0,34% entsprechen, 0,67% Inden, 0,68% β-Methylnaphthalin und als ganz kleine Menge 0,12% α-Methylnaphthalin. Vor dem Inden finden wir eine bisher noch unbekannte Substanz. Die Fläche beträgt 0,28%.

Abb. 3 zeigt die Analyse derselben Naphthalin-Probemischung, die bei der Abb. 1 verwendet wurde, mit der 2 m K-Säule. Die Analysendauer wird auf etwa die Hälfte verringert. Obwohl die Trennung durch die verkürzte Säule etwas schlechter ist, dürfte die Genauigkeit der Resultate für die Betriebsüberwachung ausreichend sein.

II. Trennung und quantitative Bestimmung von Ameisensäuremethylester, Methylal, Methanol und Wasser durch Gaschromatographie

Das bei der Formaldehydherstellung wiedergewonnene Methanol kann neben Wasser in größeren Mengen Ameisensäuremethylester und Methylal enthalten. Dieses ist durch herkömmliche chemische Analysenmethoden festzustellen.

Die Siedepunkte betragen bei Ameisensäuremethylester 31,8°, bei Methylal 42,3° und bei Methanol 64,7° C. Für die Ausarbeitung einer gaschromatographischen Trennung wählten wir wiederum Säulen, die von der Industrie hergestellt werden, z. B. die F-Säule der Firma Perkin Elmer, flüssige Phase Tetraäthylenglykoldimethyläther, und auch die K-Säule, die wir bei der Trennung der Verunreinigung des Naphthalins verwenden. Die Trennung Methanol/Wasser ist ausgezeichnet, sehr schlecht dagegen die Trennung Ameisensäuremethylester/Methylal. Aus diesem Grunde wählten wir die R-Säule, deren flüssige Phase aus Polypropylenglykol, Molekulargewicht 4500, besteht.

Abb. 4 zeigt das Gaschromatogramm einer Mischung, bestehend aus 9,7% Ameisensäuremethylester, 10,0% Methylal, 70,3% Methanol und 10,0% Wasser. Die Temperatur bei dieser Analyse beträgt 62° C und die Einspritzmenge 5 μl. Die Trennung Ameisensäuremethylester/Methylal ist bei dieser Säule gut. Dagegen ist die Trennung Methanol/Wasser nur bei einem Wassergehalt von über 5% zufriedenstellend.

Die Auswertung der Gaschromatogramme durch Planimetrieren ergab keine Übereinstimmung der Flächenprozente mit den Gewichtsprozenten, weil die Stoffe chemisch sehr verschieden sind. Die Umrechnungsfaktoren von den durch Planimetrieren gefundenen Flächen auf Gewichtsprozente betragen im einzelnen:

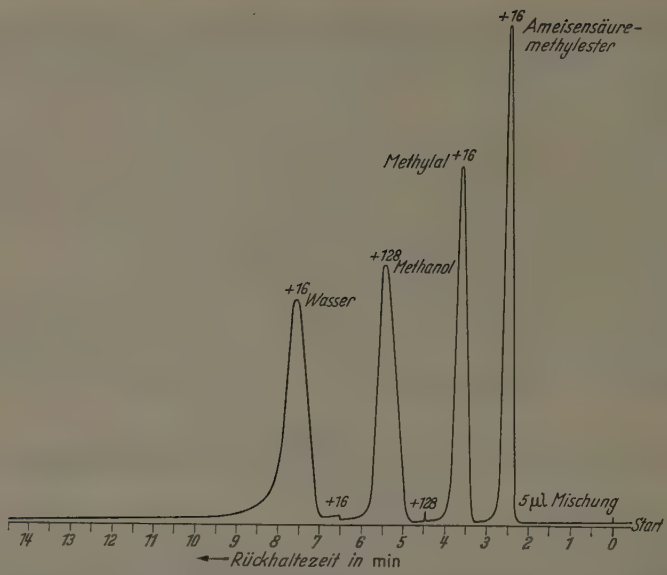


Abb. 4. Chromatogramm einer Mischung aus 9,7% Ameisensäuremethylester, 10,0% Methylal, 70,3% Methanol und 10% Wasser. *Arbeitsbedingungen:* Temperatur: 62° C; Trägergas: Helium; Druck: 1,3 atü; Strömung: 70 ml/min; Empfindlichkeit: 5; Säule: R; Länge 2 m (Polypropylenglykol)

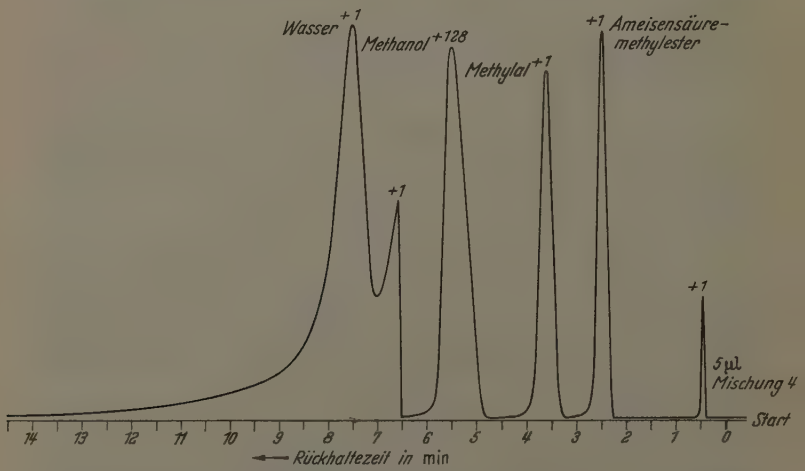


Abb. 5. Chromatogramm einer Mischung aus 0,44% Ameisensäuremethylester, 0,44% Methylal, 98,7% Methanol und 0,44% Wasser. *Arbeitsbedingungen:* Temperatur: 62° C; Trägergas: Helium; Druck: 1,3 atü; Strömung: 70 ml/min; Empfindlichkeit: 5; Säule: R; Länge: 2 m (Polypropylenglykol)

Ameisensäuremethylester 1,35, Methylal 1,4 und Wasser 1,0. Als inneren Standard setzten wir das Methanol = 1. Diese Werte sind wahrscheinlich von dem verwendeten Gerät abhängig.

Abb. 5 zeigt eine Versuchsmischung, die bedeutend weniger Wasser enthält. Der Wassergehalt beträgt nur noch 0,44%, Ameisensäuremethylester und Methylal sind in derselben Menge vorhanden. Die Trennung Methanol/Wasser ist nicht mehr ausreichend. Aus diesem

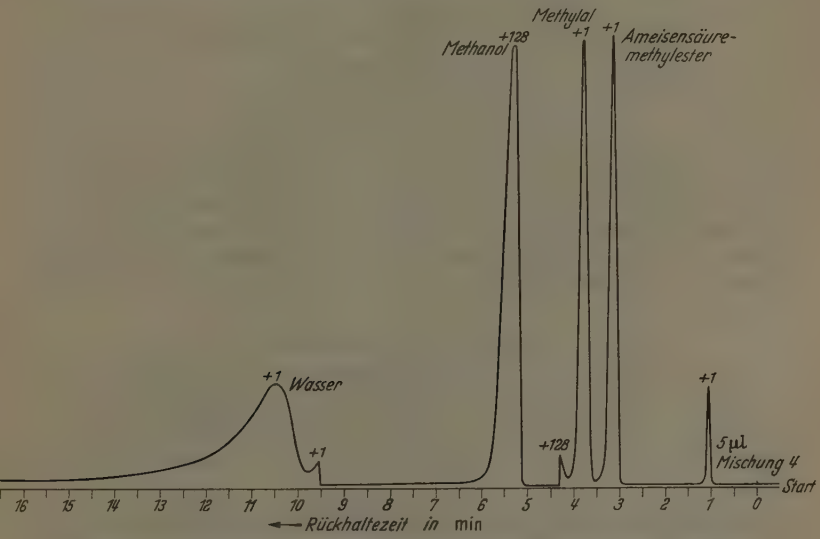


Abb. 6. Mischung wie in Abb. 5, jedoch folgende *Arbeitsbedingungen:* Temperatur: 95° C; Trägergas: Helium; Empfindlichkeit: 5; Druck: 2,1 atü; Strömung: 64 ml/min; Säulen: R; Länge: 2 m; K, Länge: 2 m

Grund kombinierten wir die 2 m R-Säule, die eine gute Trennung Ameisensäuremethylester/Methylal ergibt, mit der 2 m K-Säule, die Methanol/Wasser sehr gut trennt. Bei einer Temperatur von 95° C erhielten wir, wie es Abb. 6 zeigt, eine ausreichende Trennung Methanol/Wasser. Der Wassergehalt betrug wiederum 0,44%. (Es wurde dieselbe Versuchsmischung wie bei Abb. 5 verwendet.)

Die praktische Durchführung der Analyse im betrieblichen Alltag ergibt im allgemeinen einen Wassergehalt von über 5%, so daß oft die alleinige Verwendung der R-Säule möglich wäre.

G. Schulz, Reichhold Chemie AG, Hamburg-Wandsbek, Iversstraße 57

Organisch-chemisches Institut der Technischen Hochschule München

Gaschromatographische Trennung von N-Trifluoracetyl-dipeptid-methylestern

II. Mitteilung*

Von

FRIEDRICH WEYGAND, BRUNO KOLB und PETER KIRCHNER

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 19. Dezember 1960)

In der 1. Mitteilung[1] wurde über die prinzipielle Möglichkeit der gaschromatographischen Trennung von N-TFA-Dipeptid-methylestern berichtet. Auf mögliche Anwendungen in der Peptidchemie zur Sequenzanalyse und zur Charakterisierung von Peptiden durch „Dipeptid-finger-prints" wurde hingewiesen. In der vorliegenden Mitteilung wird über weitere Ergebnisse systematischer Art an einem größeren Material berichtet.

Apparatur und Arbeitsweise

Die Messungen wurden mit dem Fraktometer 116 H von Perkin-Elmer in Verbindung mit einem 10 mV Kompensationsschreiber (Kompensograph von Siemens und Halske) ausgeführt. Als Trägergas diente ausschließlich Helium. Es wurde eine handelsübliche Säule verwendet, die eine Länge von 2 m hatte und mit Celite gefüllt war, das mit Siliconfett imprägniert war (2 m O-Säule von Perkin-Elmer).

Zur Auswertung wurde die relative Retention q jeder Komponente bestimmt, indem der direkt aus dem Fraktogramm entnommene Wert (in Zentimeter, gemessen vom Luftpeak bis zum Maximum der Bande) auf den Wert eines Standards (Myristinsäuremethylester) bezogen wurde. Die erhaltenen q-Werte sind reine Verhältniszahlen und sind nur abhängig von der Temperatur und der stationären Phase. Sie sind unabhängig von der Säulenlänge, der Beladung und der Strömungsgeschwindigkeit. Die Auswertung über die relative Retention wurde gewählt, weil es bei vielen Trennungen von N-TFA-Dipeptid-methylestern notwendig ist, die Säulenlänge und die Strömungsgeschwindigkeit zu variieren.

Die Substanzen wurden mit einer Hamilton Microliter Syringe 701 als Lösung in Essigester eingespritzt. Es wurden 20—100 μg von jeder Komponente verwendet.

Ergebnisse

In der Tabelle sind die relativen Retentionswerte q von N-TFA-Dipeptid-methylestern unter den Arbeitsbedingungen aufgeführt, und zwar im Interesse der Übersichtlichkeit in Form einer der beiden möglichen

* Über den Inhalt der 1. und der 2. Mitteilung wurde auf der Tagung der Fachgruppe für Analytische Chemie der Gesellschaft Deutscher Chemiker in München im Oktober 1960 vorgetragen.

Dipeptidreihen. Bei der einen Reihe wird die aminoendständige, bei der anderen die carboxylendständige Aminosäure fixiert, z. B. Ala.X: Ala.Ala., Ala.Gly, Ala.Val, ... Ala.Phe und X.Ala: Ala.Ala, Gly.Ala, Val.Ala, ... Phe.Ala.

Man erkennt, daß die Reihenfolge der entsprechenden Glieder in jeder Reihe dieselbe ist. In Abb. 1 sind im doppeltlogarithmischen

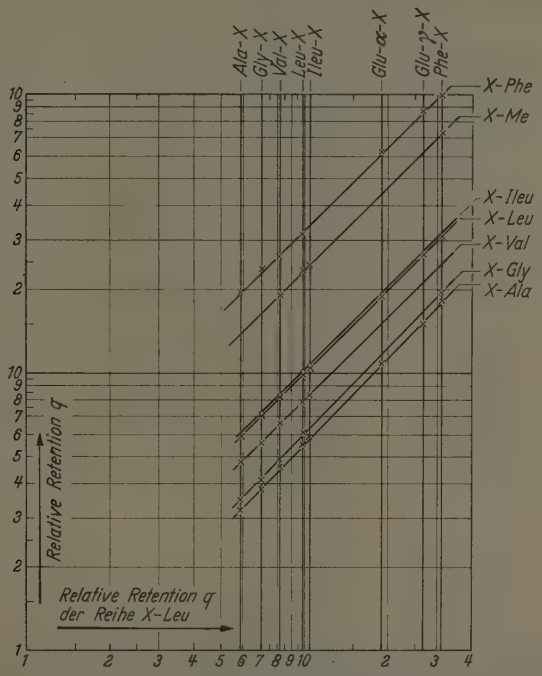


Abb. 1. Relative Retention q von N-TFA-Dipeptid-methylestern (Myristinsäuremethylester = 1). Stationäre Phase: Siliconfett; Temperatur: 225° C

Maßstab die q-Werte auf der Abszisse *und* der Ordinate aufgetragen. Als Bezugsreihe wurden die N-TFA-Dipeptid-methylester der Reihe X.Leu gewählt, da von ihr die meisten Glieder vorhanden waren und außerdem diese Reihe in der Mitte der bisher gemessenen Reihen liegt. Die resultierende 45°-Gerade dient als Bezugsgerade für die weiteren Peptidreihen. Senkrecht über und unter dem Punkt für Ala.Leu wurden die Werte der Reihe Ala.X, über und unter Gly.Leu die der Reihe Gly.X usw. aufgetragen. Die Punkte der Reihen X.Ala, X.Gly, ... X.Phe lassen sich durch Geraden verbinden, die zu der Bezugsgeraden parallel sind. Durch

diese Darstellung lassen sich nicht nur die q-Werte der einzelnen Komponenten auf der Ordinate ablesen, es lassen sich auch die q-Werte von N-TFA-Dipeptid-methylestern angeben, die noch nicht dargestellt bzw. gemessen worden sind, da sich die Lage jeder Verbindung eindeutig aus

Tabelle. *Zusammenstellung der relativen Retention q von N-TFA-Dipeptid-methylestern (Myristinsäuremethylester = 1)*

Arbeitsbedingungen. Säule 2 m O-Säule; Temperatur 225° C; Strömungsgeschwindigkeit 55 Nml He/min bei 21° C

L-Ala.L-Ala	0,32	L-Ileu.L-Ala	0,59
L-Ala.Gly	0,35	L-Ielu.L.Val	0,83
L-Ala.L-Val	0,48	L-Ileu.L-Leu	1,04
L-Ala.L-Leu	0,59	L-Ileu.L-Ileu	1,06
L-Ala.L-Phe	1,95	L-Ileu.L-Met	2,45
Gly.L-Ala	0,38	L-Glu-α.L-Ala	1,09
Gly.Gly	0,41	L-Glu-α.L-Leu	1,88
Gly.L-Val	0,56	L-Glu-α.L-Phe	6,25
Gly.L-Leu	0,70	L-Glu-γ.L-Ala	1,50
Gly.L-Ileu	0,71	L-Glu-γ.L-Leu	2,68
Gly.L-Phe	2,37	L-Glu-γ.L-Phe	8,78
L-Val.L-Ala	0,46	L-Phe.L-Ala	1,83
L-Val.Gly	0,49	L-Phe.Gly	1,98
L-Val.L-Val	0,66	L-Phe.L-Leu	3,11
L-Val.L-Leu	0,82	L-Phe.L-Met	7,25
L-Val.L-Ileu	0,83	L-Phe.L-Phe	9,93
L-Val.L-Met	1,90		
L-Val.L-Phe	2,60		
L-Leu.L-Ala	0,55		
L-Leu.Gly	0,61		
L-Leu.L-Val	0,78		
L-Leu.L-Leu	0,98		
L-Leu.L-Ileu	1,01		
L-Leu.L-Met	2,35		
L.Leu.L-Phe	3,14		

dem Schnittpunkt zweier Geraden ergibt (z.B. Ala.Val: Schnittpunkt der Geraden Ala.X und X.Val). Die geringen Abweichungen liegen im allgemeinen innerhalb der Fehlergrenzen. Man kann sich auch schnell darüber orientieren, ob ein Peak in einem Fraktogramm etwa nur einem oder mehreren N-TFA-Dipeptid-methylestern zugeordnet werden kann.

Diese Art der Darstellung hat sich auch als recht zweckmäßig zur Untersuchung verschiedener stationärer Phasen erwiesen, was von Bedeutung ist, wenn Verbindungen getrennt werden müssen, die mit einer stationären Phase nicht trennbar sind. Es ist nicht notwendig, die q-Werte aller notwendigen N-TFA-Dipeptid-methylester zu bestimmen. Vielmehr genügt es, die Glieder zweier Peptidreihen, nämlich der jeweils zu wählenden Bezugsreihe und einer senkrechten Peptidreihe zu

bestimmen, da dann die Lage aller anderen Verbindungen in der oben angegebenen Weise festgelegt ist.

Bezüglich der in dieser Hinsicht zur Zeit laufenden Untersuchungen läßt sich schon so viel sagen, daß bei Verwendung einer anderen stationären Phase (z. B. Apienzonfett) die Peptidgeraden sich in ihrer Lage von den mit Siliconfett erhaltenen unterscheiden, wodurch Trennungen möglich werden, die mit Siliconfett als stationärer Phase nicht durchführbar sind.

Somit gibt die gewählte Darstellungsweise eine Trenncharakteristik für die entsprechende stationäre Phase, und es ist möglich, für ein gegebenes Trennproblem die besten Bedingungen zu wählen. Beispielsweise wird man für die Sequenzanalyse eines Peptids bei bekannter Aminosäurezusammensetzung für die zu erwartenden Dipeptide an Hand verschiedener Trenncharakteristiken die zweckmäßigste Säule und die optimalen Betriebsbedingungen wählen können.

Hinsichtlich der in der 1. Mitteilung[1] erwähnten Trennbarkeit eines Diastereoisomerenpaares sei noch erwähnt, daß inzwischen die Trennung diastereoisomerer N-TFA-Dipeptid-methylester an weiteren Beispielen realisiert wurde. Hierüber soll später gesondert berichtet werden.

Literatur

[1] WEYGAND, F., B. KOLB, A. PROX, M. A. TILAK u. I. TOMIDA: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **322**, 38 (1960).

Prof. Dr. F. WEYGAND, Organisch-chemisches Institut der Technischen Hochschule, München 2, Arcisstraße 21

Koninklijke/Shell-Laboratorium, Amsterdam (Shell Internationale Research Maatschappij N. V.)

Analyse von Alkylaluminiumverbindungen mit Hilfe der Gaschromatographie

Von

R. DIJKSTRA und E. A. M. F. DAHMEN

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 1. Dezember 1960)

Die Probleme, denen man sich bei der Analyse der niedrigeren Alkylaluminiumverbindungen gegenüber sieht, lassen sich am besten an Hand der mit dem als Katalysator bei der Ziegler-Synthese von Polyäthylen bekannt gewordenen Triäthylaluminium gewonnenen Erfahrungen besprechen.

Die starke Neigung des Triäthylaluminiums, mit Sauerstoff und Wasser zu reagieren, gibt schon bei der Herstellung zu Schwierigkeiten Anlaß. Lagerung, Transport und sogar die Probenahme sind demzufolge riskant und können selbst zum Mißlingen der Analyse führen. Verunreinigung mit Luftsauerstoff veranlaßt z.B. Bildung von Diäthylaluminiumäthoxyl.

Übrigens ist, vom analytischen Standpunkt aus betrachtet, die Bestimmung der Zahl der gebildeten Äthoxylgruppen nicht schwierig. Nach vorsichtig geführter Hydrolyse läßt sich das entstandene Äthanol abdestillieren und z.B. colorimetrisch mit Hilfe der Cer(IV)-Ammoniumnitratmethode nach Reid u. Truelove[4] bestimmen.

Zur schnellen Qualitätsprüfung des Triäthylaluminiums nach Lagerung leistet diese Methode gute Dienste. Dazu kann man aber auch das von ihr völlig verschiedene Titrationsverfahren von Bonitz[2] anwenden. Dieses beruht auf der Komplexbildung von Triäthylaluminium mit Azinen, wie Isochinolin, die konduktometrisch leicht verfolgt werden kann. Bonitz hat nachgewiesen, daß nach der Bildung eines 1:1-Komplexes die Leitfähigkeit plötzlich zurückgeht. Der Azinverbrauch ist ein genaues Maß für die vorhandene Menge an Triäthylaluminium, weil Diäthylaluminiumäthoxyl keine Komplexverbindung bildet. Mit Hilfe dieser eleganten Methode läßt sich also eine Abnahme des Triäthylaluminiumgehalts rasch und in zuverlässiger Weise feststellen.

Analytische Fragen ganz anderer Art erheben sich bei der Erzeugung des Triäthylaluminiums nach einer modernen Zweistufensynthese von Ziegler u. Mitarb.[6].

In der ersten Stufe dieser Synthese entsteht durch Reaktion einer schon vorhandenen Menge Triäthylaluminium mit Wasserstoff und Aluminium das Diäthylaluminiumhydrid, das darauf durch Addition von Äthen in Triäthylaluminium umgesetzt wird. Wie aus nachstehenden Reaktionsgleichungen folgt, erhält man aus zwei Molen der Ausgangsverbindung drei Mole Triäthylaluminium-Endprodukt:

1. Stufe:

$$2\ \mathrm{Al(Ät)_3} + \frac{3}{2}\ \mathrm{H_2} + \mathrm{Al} \xrightarrow[50—200\ \mathrm{atm}]{110—140\,^\circ\mathrm{C}} 3\ \mathrm{AlH(Ät)_2}$$

2. Stufe:

$$3\ \mathrm{HAl(Ät)_2} + 3\ \mathrm{C_2H_4} \xrightarrow[10\ \mathrm{atm}]{80—100\,^\circ\mathrm{C}} 3\ \mathrm{Al(Ät)_3}\,.$$

Ein erschwerender Faktor ist, daß in der zweiten Stufe das Äthen auch die Al-C-Bindung angreifen kann, wodurch Butylgruppen entstehen.

Nachstehend folgt nun die Beschreibung eines Verfahrens zur raschen Bestimmung der Zusammensetzung des Zwischenproduktes $\mathrm{AlH(Ät)_2}$

und des Endproduktes $Al(Ät)_3$. In diesem Endprodukt können also restliches Diäthylaluminiumhydrid und außerdem Aluminiumbutylverbindungen enthalten sein; letztere werden bequemlichkeitshalber als Tributylaluminium in den Analysenergebnissen aufgeführt.

Kleinere Mengen Hydrid kann man mit Hilfe der Bonitz-Titration, durch Messung der mit Methylanilin[3] als Reaktionsmittel erzeugten Wasserstoffmenge oder durch photometrische Bestimmung von Azomethinkomplexen nach NEUMANN[3] leicht ermitteln. Auch die Bestimmung der Aktivität, die sich als die gesamte Menge an Trialkylaluminium und Dialkylaluminiumhydrid (in Millimol) je Gramm der Probe definieren läßt, bietet keine Schwierigkeiten. Zu diesem Zweck kann man wiederum das Bonitz-Verfahren, das sogenannte Ammoniak-Additionsverfahren[5] oder, falls Alkoxylgruppen nicht vorhanden sind, die „reducing capacity"[1] anwenden.

Auskunft über die Menge an Tributylaluminium liefern diese Arbeitsweisen niemals. Dazu muß das bei der Hydrolyse freiwerdende Gas analysiert werden, z. B. mit Hilfe der Gaschromatographie. Wenn außer der Zusammensetzung auch noch die insgesamt freigewordene Gasmenge (in Millimol) gemessen wird, läßt sich daraus die Aktivität ermitteln.

Die gesamte Gasmenge kann man gemäß einem von ZIEGLER u. Mitarb. angegebenen Verfahren messen, aber zur Bestimmung der gebildeten Menge an n-Butan ist dieses Verfahren weniger geeignet, weil ein Teil des Gases in der zur Zersetzung verwendeten Flüssigkeit gelöst bleibt.

Um nun diesen Nachteil völlig aufzuheben, haben wir dem Gaschromatographen einen Zersetzungsteil vorgeschaltet, wo die Hydrolyse stattfinden kann. Nach Beendung dieser Hydrolyse wird alles entstandene Gas vom Trägergas in die chromatographische Säule geführt, worauf die Komponenten getrennt und gemessen werden. Zur Bestimmung der gesamten bei der Hydrolyse gebildeten Gasmenge (in Millimol) muß man sich der „Markierungstechnik" bedienen. Dazu ist n-Pentan besonders geeignet.

Zunächst werden nun die verwendete Apparatur und Analysetechnik besprochen.

Apparatur und Verfahren

Zersetzungsteil (Abb. 1). Der Zersetzungsteil besteht aus einem engen Glasrohr das 30 Gew.-% Laurinsäure* auf einem porösen Material (Sil-O-Cel, 50—80 mesh) enthält und das an einem Ende mit dem Gaschromatographen und am anderen Ende mit einem Halter für eine Gummikappe („serum cap") verbunden ist.

---

* Außer Laurinsäure wurde versuchsweise Dodecanol als Zersetzungsmittel angewandt; es stellte sich jedoch heraus, daß diese Verbindung erst bei höheren Temperaturen eine maximale Ausbeute an Gas lieferte, was bei Laurinsäure schon bei Zimmertemperatur der Fall ist.

Das Trägergas wird mit pneumatischen Membranventilen entweder durch den Zersetzungsteil oder durch eine Nebenleitung geführt. Diese Anordnung hat den Vorteil, daß die Probe während einer festgesetzten Zeit (3—5 min) in einem geschlossenen System zersetzt und die Triäthylaluminiumanalyse mit ungefährlichen Verdünnungen (300—400 Mmol/l) durchgeführt werden kann. Proben etwa dieser Konzentration mit Cyclohexan als Lösungsmittel werden mit Hilfe einer Injektionsspritze auf den Inhalt des Zersetzungsrohrs gespritzt. Nach vollständiger Zersetzung werden die entstandenen Gase — Wasserstoff, Äthan und n-Butan — in die chromatographische Säule hineingespült.

Schaltung der Säulen. Nach einigen Bestimmungen würde „Durchbruch" des Lösungsmittels Cyclohexan auftreten. Dies läßt sich vermeiden, indem man zwei

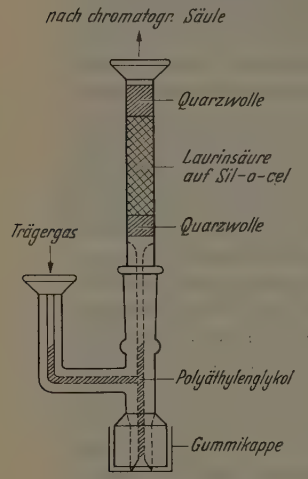


Abb. 1. Zersetzungsteil mit Halter für Gummikappe

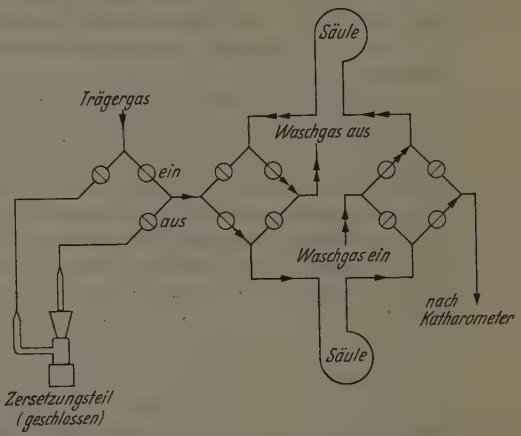


Abb. 2. Schaltung der Säulen. (Die Kreise stellen pneumatisch betätigte Ventile mit Teflonmembranen dar)

identische Säulen abwechselnd benutzt, von denen eine automatisch vom Trägergas in umgekehrter Richtung ausgespült wird, während in der anderen das bei der Zersetzung gebildete Gas getrennt wird.

Das ganze System ist in Abb. 2 schematisch dargestellt.

Tabelle 1. *Relative Empfindlichkeiten von Wasserstoff, Äthan und n-Butan in bezug auf Äthan in Wasserstoff (= 100)*

Komponenten / Trägergas	Relative Empfindlichkeit		
	Wasserstoff	Äthan	n-Butan
Wasserstoff	—	100	147
Stickstoff	718*	22	164
Argon	1655	134	57*

* Umgekehrtes Signal.

Wahl der Versuchsbedingungen. In Tab. 1 sind die relativen Empfindlichkeiten der Komponenten n-Butan, Äthan und Wasserstoff in den Trägergasen Wasserstoff, Stickstoff und Argon aufgeführt. Sie wurden unter folgenden Bedingungen gemessen: Wärmeleitzelle mit Platindrähten von 30 Ω, Temperatur der Zelle 30° C, Brückenstrom 150 Milliamp. Für die Analyse des Triäthylaluminiums wurden immer auch diese Bedingungen gewählt.

Aus der Tabelle geht hervor, daß die hier brauchbaren Trägergase entweder gegen Äthan oder gegen n-Butan eine niedrige Empfindlichkeit besitzen. Außerdem stand eine geeignete stationäre Phase, die bei der Betriebstemperatur des Chromatographen (30° C) die Trennung eines Gemisches von Wasserstoff, Äthan und n-Butan bewirken kann, nicht zur Verfügung. Es wurde daher beschlossen, die Analyse in zwei Vorgängen durchzuführen:

1. Die quantitative Bestimmung von Äthan und n-Butan. Das geeignete Trägergas ist natürlich Wasserstoff. Als stationäre Phase kommt z.B. Dibutylphthalat in Betracht.

2. Die Bestimmung des Verhältnisses zwischen Wasserstoff und Äthan. Als Trägergas ist Argon besonders geeignet. Bei Verwendung von Silicagel wird eine gute Trennung erzielt.

Darstellung von zur Zersetzungschromatographie geeigneten Triäthylaluminium-Verdünnungen. Geeignete Verdünnungen erhält man, wenn man 0,3—0,5 ml Probe in eine kleine, mit einer Gummikappe verschlossene Medizinflasche injiziert, die etwa 10 ml trockenes und sauerstofffreies Cyclohexan enthält. Auf diese Weise lassen sich ohne jede Gefahr Verdünnungen von 300—400 Mmol/l darstellen. Sie können ohne weiteres zur Bestimmung der Zusammensetzung des aktiven Teils einer Triäthylaluminiumprobe benutzt werden.

Zur Ermittlung der Aktivität selber muß jedoch die insgesamt entwickelte Gasmenge je Gramm der Probe bekannt sein. Daher wird in die Probeflasche auch noch 0,4—0,6 ml n-Pentan eingespritzt, das bei der chromatographischen Analyse als Vergleichssubstanz auftritt. Sowohl die eingespritzte Menge Triäthylaluminium als das Pentan müssen genau gewogen werden.

Die so erhaltenen Verdünnungen sind etwa einen Tag haltbar.

Nachprüfung der Zersetzung. Zur Prüfung, ob vielleicht Nebenreaktionen auftreten würden — wie z.B. Zersetzung des Triäthylaluminiums zu Hydrid und Äthen —, wurden große Proben einzeln zersetzt und das Zersetzungsgas über Silicagel chromatographiert. Bei diesen Versuchen, die bei Zimmertemperatur durchgeführt wurden, ließ sich nicht die geringste Spur von Äthen feststellen. Hydridfreie Proben bildeten bei der Zersetzung keinen Wasserstoff.

Ergebnisse

Abb. 3 zeigt die Chromatogramme, wie sie bei den beiden oben beschriebenen analytischen Vorgängen in Wasserstoff und Argon als Trägergas erhalten wurden.

Aus den korrigierten Zackenflächen von Äthan, Wasserstoff, n-Butan und n-Pentan und den Gewichtsmengen des Triäthylaluminiums und des

Pentans lassen sich die Mengen der einzelnen Gase in Millimol/g leicht ermitteln. Daraus ergibt sich sofort die Aktivität der Probe in Millimol/g:

$$\text{Aktivität (mmol/g)} = {}^1/_3\,(M_H + M_{\ddot{A}} + M_B)\,, \qquad (1)$$

wobei M_H, $M_{\ddot{A}}$ und M_B die Mengen an Wasserstoff, Äthan und Butan darstellen. Aus Gl. (1) läßt sich der Gehalt an aktivem Material (in Gew.-%) ermitteln:

$$\text{Gehalt an aktivem Material (Gew.-\%)} = M_H + 3{,}8\,M_{\ddot{A}} + 6{,}6\,M_B. \qquad (2)$$

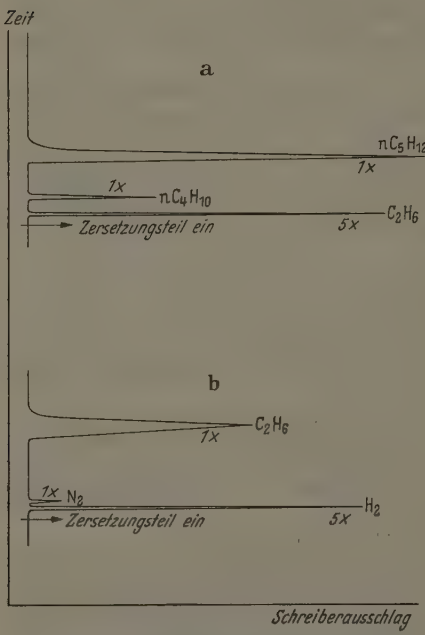


Abb. 3 a u. b. Beispiele eines Chromatogramms.
a Quantitative Bestimmung von Äthan und n-Butan; Trägergas: H_2; Säule: Dibutylphthalat.
b Bestimmung des H_2/C_2H_6-Verhältnisses; Trägergas: Argon; Säule: Silicagel

Die — scheinbaren — Zusammensetzungen der Probe und des aktiven Teils dieser Probe, als Prozentsatz an Diäthylaluminiumhydrid, Triäthylaluminium und Tri-n-butylaluminium ausgedrückt, können jetzt auch einfach ermittelt werden.

Korrektur für hohe Äthoxylgehalte. Da auch z. B. Diäthylaluminiumäthoxyl einen Gasbeitrag liefert und es nahezu feststeht, daß sich tatsächlich Monoäthoxylverbindungen bilden, müssen die gaschromatographischen Daten auf den in anderer Weise (siehe Einleitung) gefundenen Äthoxylwert korrigiert werden. Dieser gibt die Menge an Äthanol (in Mmol) an, die 1 g Probe bei Hydrolyse liefern kann. Die Aktivität ermittelt man nun gemäß:

$$\text{Aktivität (Mmol/g)} = {}^1/_3\,(M_H + M_{\ddot{A}} - 2\,M_{\text{Äthanol}} + M_B)\,.$$

Aller Wahrscheinlichkeit nach hat das Vorhandensein von Äthoxylgruppen keinen Einfluß auf die Zusammensetzung des aktiven Materials, weil sich diese Gruppen verhältnismäßig über Triäthylaluminium, Diäthylaluminiumhydrid und Tributylaluminium verteilen werden. Sie

kann also ohne weiteres aus den chromatographisch bestimmten Gasmengen ermittelt werden.

Genauigkeit der Methode

Die Zusammensetzung des aktiven Materials einer Triäthylaluminiumprobe kann selbstverständlich mit größerer Genauigkeit bestimmt werden als die gesamte Gasmenge, die nach der Zersetzung mit n-Pentan als Vergleichssubstanz gemessen wird. Die Wiederholbarkeit der beiden Bestimmungen wurde an 18 gesondert hergestellten Verdünnungen eines Triäthylaluminiumkonzentrats untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab. 2 zusammengefaßt.

Tabelle 2. *Wiederholbarkeit der gaschromatographischen Methode mit vorhergehender Zersetzung*

	Aktivität (Mmol/g)	Gehalt an aktivem Material (Gew.-%)	Zusammensetzung des aktiven Materials (Mol-%)		
			$(Et)_2AlH$	$(Et)_3Al$	$(n\text{-}Bu)_3Al$
Mittelwert	6,9	82,2	12,4	78,0	9,6
Standardabweichung	0,1	1,13	0,3	0,3	0,17
Wiederholbarkeit	0,3	3,4	1,0	1,0	0,5

Nachweis höherer Alkylgruppen in Triäthylaluminium

Einige Proben mit einem hohen Gehalt an Butylgruppen wurden auf ihren etwaigen Gehalt an höheren Alkylgruppen untersucht, die bei der Herstellung von Triäthylaluminium aus Diäthylaluminiumhydrid und Äthen entstehen können. Diese Proben wurden in reinem Toluol hydrolysiert, wonach das entstandene Aluminiumhydroxyd mit verdünnter Säure gelöst wurde. Der Extrakt wurde darauf gaschromatographisch mit Detektion durch Flammenionisation untersucht, wobei folgende Komponenten gefunden wurden: n-Hexan, 3-Methylpentan, n-Octan, 3-Methylheptan.

Das Vorhandensein dieser gesättigten Kohlenwasserstoffe nach Hydrolyse ist ein Beweis dafür, daß in der ursprünglichen Probe tatsächlich Hexyl- und Octylgruppen enthalten waren.

Bei höheren Butylgehalten ist also einige Vorsicht bei der Deutung der Analysenergebnisse geboten.

Analyse anderer Alkylaluminiumverbindungen

Die beschriebene gaschromatographische Methode mit vorhergehender Zersetzung eignet sich auch zur Analyse von Trimethylaluminium, Diäthylaluminiumchlorid, Tri-n-propylaluminium und Triisobutylaluminium. Zur Bestimmung des Wasserstoff/Alkan-Verhältnisses sind sowohl die stationäre Phase als das Trägergas der Probe anzupassen. Tab. 3 gibt die erforderlichen Anweisungen.

Tabelle 3. *Bestimmung des Wasserstoff/Alkan-Verhältnisses*

Alkylaluminiumverbindung	Säulenfüllung	Trägergas
Trimethylaluminium	Silicagel	Argon
Triäthylaluminium	Silicagel	Argon
Diäthylaluminiumchlorid	Silicagel	Argon
Tripropylaluminium	Dibutylphthalat	Stickstoff
Triisobutylaluminium	Dibutylphthalat	Stickstoff

Zusammenfassung

Eine gaschromatographische Methode zur Bestimmung der Zusammensetzung von Aluminiumalkylverbindungen wird beschrieben. Insbesondere eignet sie sich zur Bestimmung des Gehaltes an aktivem Material und des Verhältnisses zwischen den Mengen an Äthylgruppen, Butylgruppen und Hydridwasserstoff in Triäthylaluminium, das mit der Zweistufensynthese nach Ziegler dargestellt wurde.

Die mit Cyclohexan stark verdünnten Proben werden zuerst mit Hilfe von Laurinsäure auf einem Träger in einem Zersetzungsrohr zersetzt. Darauf werden die Äthan/Butan- und Äthan/Wasserstoff-Verhältnisse in den gebildeten Gasen in gesonderten Säulen bestimmt. Im ersten Fall verwendet man Wasserstoff und Dibutylphthalat, im zweiten Argon und Silicagel als Trägergas bzw. stationäre Phase. Die absolute Menge wird durch Zusatz einer bekannten Menge n-Pentan als Vergleichssubstanz ermittelt.

Literatur

[1] Bartkiewicz, S. A., u. J. W. Robinson: Anal. chim. Acta (Amsterdam) **20**, 326 (1959); vgl. diese Z. **174**, 57 (1960). — [2] Bonitz, E.: Chem. Ber. **88**, 742 (1955). — [3] Neumann, W. P.: Liebigs Ann. Chem. **629**, 23 (1960). — [4] Reid, V. W., u. R. K. Truelove: Analyst **77**, 325 (1952); vgl. diese Z. **139**, 225 (1953). — [5] Ziegler, K., u. H. G. Gellert: Liebigs Ann. Chem. **629**, 20 (1960). — [6] Ziegler, K., H. G. Gellert, H. Lehmkuhl, W. Pfohl u. K. Zosel: Liebigs Ann. Chem. **629**, 1 (1960).

Dr. R. Dijkstra; Dr. E. A. M. F. Dahmen; Koninklijke Shell-Laboratorium, Amsterdam-N, Badhuisweg 3, Postbus 3003 (Holland)

Institut für Silikon- und Fluorkarbon-Chemie Radebeul-Dresden

Über Silicone LI*

Gaschromatographische Untersuchungen an Methylhydrocyclosiloxanen

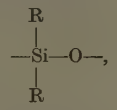
Von

HARALD ROTZSCHE und HARALD RÖSLER

Mit 4 Textabbildungen

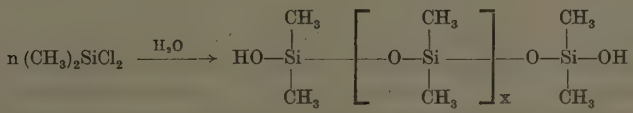
(Eingegangen am 15. Oktober 1960)

Siliconkautschuk ist aufgebaut aus langen Kettenmolekülen, in denen sich die difunktionelle Siloxaneinheit

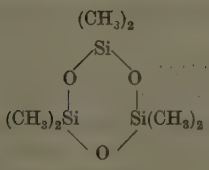


die in der Siliconchemie mit D bezeichnet wird, mehr als 4000 mal wiederholt. Die Seitenglieder R stellen Methylgruppen, in untergeordnetem Maße auch Phenyl- und Vinylgruppen, dar.

Als Ausgangsprodukt für diesen Kautschuk dient das Dimethyldichlorsilan (I), das bei der Hydrolyse und gleichzeitig ablaufenden Kondensation sowohl lineare (II) als auch cyclische Polysiloxane (III, IV, V) gibt:

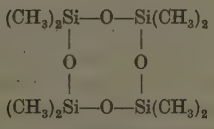


(I) (II)



(III)

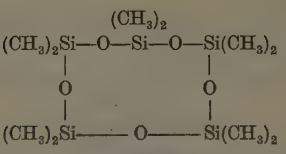
Hexamethylcyclotrisiloxan, D_3



(IV)

Octamethylcyclotetrasiloxan, D_4

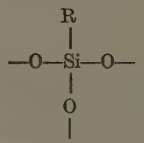
* 50. Mitteilung: RICH. MÜLLER, R. KÖHNE u. S. SLIWINSKI, J. prakt. Chem., [4] **11**, 336 (1960).



(V)

Decamethylcyclopentasiloxan, D_5

Durch Polymerisation unter Aufspaltung der Ringe oder durch Weiterkondensation der linearen Produkte erhält man dann den Silicon-Rohkautschuk. Die Vulkanisationsreaktion führt diesen in den eigentlichen Silicongummi über. Sie besteht aus einer Quervernetzung der Makromoleküle, welche die elastischen Eigenschaften bedingt. Wesentlich ist jedoch, daß eine derartige Quervernetzung keinesfalls bereits im Silicon-Rohkautschuk auftritt, da dann eine weitere Verarbeitung zu Gummi sehr erschwert oder ganz verhindert wird. Zu diesem Zweck dürfen die Ausgangsprodukte nur D-Einheiten, nicht aber trifunktionelle T-Einheiten



enthalten, wie sie bei der Hydrolyse von Methyltrichlorsilan CH_3SiCl_3 (VI) entstehen.

Man kann nun so verfahren, daß man (I) möglichst weitgehend von (VI) reinigt, was aber wegen der nur 4° C Unterschied aufweisenden Siedepunkte nicht in befriedigender Weise möglich ist. Solche trifunktionellen Einheiten sind nämlich bereits in Mengen um 0,01—0,1% schädlich. Günstig ist es dagegen, wenn man von den Hydrolyseprodukten ausschließlich das D_4 (IV) verwendet, das sich bei entsprechender Lenkung der Hydrolyse als Hauptprodukt bildet. Es läßt sich durch Destillation frei von trifunktionellen Verunreinigungen erhalten, da diese in die nichtflüchtigen linearen Anteile oder in wesentlich höher siedende Verbindungen eingebaut werden.

Trotz dieser Maßnahme traten gelegentlich auch in Polymerisaten aus D_4 (IV) Vernetzungen auf, die sich zunächst nicht deuten ließen. Die Aufklärung der Ursache gelang auf gaschromatographischem Wege. Hierbei fanden wir in technischen Ansätzen von Dimethyldichlorsilan (I) neben Methyltrichlorsilan (VI) noch sehr geringe Mengen Methylhydrodichlorsilan CH_3HSiCl_2 (VII)*.

* Eine Veröffentlichung über Gas-Flüssigkeits-Chromatographie von Chlorsilanen ist in Vorbereitung.

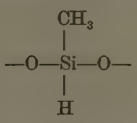
Das trifunktionelle Methyltrichlorsilan konnte für die Störungen nicht verantwortlich sein, da seine Hydrolyseprodukte, wie bereits oben erwähnt, nicht in das Zwischenprodukt D_4 gelangen können. Dagegen kann sich (VII) bei der Hydrolyse in ähnlicher Weise wie (I) zu cyclischen Verbindungen umsetzen.

Zum Beispiel:

$$\underset{\text{(VII)}}{4\,CH_3HSiCl_2} + 4\,H_2O \rightarrow \underset{\text{(VIII)}}{(CH_3HSiO)_4} + 8\,HCl$$

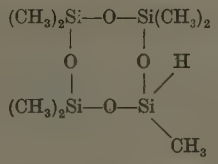
Dieses bereits beschriebene[9,10] 1,3,5,7-Tetramethylcyclotetrasiloxan (VIII) (Kurzbezeichnung D_4^H) konnte jedoch gaschromatographisch im nicht einwandfrei verarbeitbaren D_4 nicht festgestellt werden. Statt dessen wurden an den Verteilungsflüssigkeiten Triphenylphosphat (das wir dem vielfach beschriebenen Trikresylphosphat wegen seiner einheitlichen Zusammensetzung vorziehen), Dinonylphthalat, Apiezon L und Siliconöl DC 703 in diesen zu beanstandenden Ansätzen von D_4 als Verunreinigungen etwa 0,5% Hexamethylcyclotrisiloxan D_3 (III) und 0,02—0,2% einer unbekannten Substanz gefunden, deren Siedepunkt dicht unter dem des D_4 liegen mußte. Das D_3 stört bei der Gummiherstellung nicht, da es ebenso wie das D_4 nur difunktionelle Gruppen enthält, die keine Vernetzung hervorrufen.

Es ist nun sehr wahrscheinlich, daß die bei der Hydrolyse von Methylhydrodichlorsilan (VII) entstehenden Methylhydrosiloxan-Einheiten D^H



gleichmäßig an Stelle von Dimethylsiloxan-Einheiten in die Reaktionsprodukte (II)—(V) eingebaut werden und in Form der Cyclen mit in das D_4 gelangen können.

Wir vermuteten nun, daß die bei der Hydrolyse von (VII) auftretenden D^H-Einheiten wegen ihrer geringen Konzentration jeweils nur einmal in ein cyclisches Tetramermolekül eingefügt werden und somit in Form der Verbindung (IX)

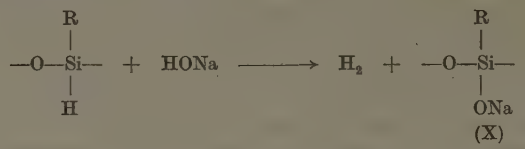


(IX)

Heptamethylcyclotetrasiloxan, D_3D^H

in das D_4 gelangen sollten. Diese noch nicht beschriebene Verbindung* ähnelt dem D_4 sehr stark, nur ist eine Methylgruppe gegen einen Si-ständigen Wasserstoff ausgetauscht. Sie sollte daher dicht unter dem D_4 sieden und sich erst bei sehr wirksamem Fraktionieren von diesem abtrennen lassen.

Dieses D_3D^H kann nun durchaus schon in kleinen Konzentrationen bei Polymerisationen das D_4 zur Vernetzung bringen. Die Si-H-Bindung verhält sich nämlich chemisch ganz anders als die C-H-Bindung. Sie setzt sich z. B. mit Alkali unter Wasserstoffbildung um:



Auf Messung des dabei entwickelten Wasserstoffes beruht ja bekanntlich die quantitative Bestimmung von Si-H-Bindungen[7,11].

In den betreffenden D_4-Ansätzen konnten wir tatsächlich Si-ständigen Wasserstoff nachweisen. Die Polymerisation des D_4 zum hochmolaren Siliconkautschuk wird meist mit Alkali vorgenommen. Dabei entsteht nach der eben angegebenen Umsetzung bei Gegenwart von Si-H-Bindungen nachträglich die trifunktionelle Gruppe (X), die durch weitere Kondensation unerwünschte Vernetzungen verursacht.

Um nachprüfen zu können, ob die Verbindung (IX) wirklich gebildet wird, setzten wir ein Gemisch von Dimethyldichlorsilan (I) mit Methylhydrodichlorsilan (VII) im Verhältnis 3 : 1 mit Wasser um und destillierten die flüchtigen cyclischen Verbindungen von dem nichtflüchtigen, aus linearen Anteilen bestehenden Öl ab. Dieses Öl sollte also Heptamethylcyclotetrasiloxan (IX) neben einer Reihe weiterer Cyclen verschiedener Ringgröße und unterschiedlichen SiH-Gehalts enthalten. Wir destillierten nochmals die bis 175° C siedenden Anteile heraus, die nun im wesentlichen D_4 und die D^H-haltigen Tetrameren umfassen sollten (Fraktion A). Als B wird der Rückstand dieser Destillation bezeichnet, in dem wir vor allem höhere Cyclen erwarteten.

A und B untersuchten wir gaschromatographisch und fanden durch Vorversuche, daß Triphenylphosphat und Dinonylphthalat für die Cyclosiloxane keine gut wirkenden Verteilungsflüssigkeiten sind. Apiezon L ist zwar geeignet, wird jedoch von Siliconöl DC 703 weit übertroffen. Es werden deshalb nur die Ergebnisse mitgeteilt, die wir an der Trennsäule DC 703 erhielten. Dieses Siliconöl ermöglicht offenbar recht gute Trennungen von Cyclosiloxanen.

* Siehe Tab. 2, Anm. **.

Apparatives. Es wurde eine Apparatur „Gasofract" der Dr. Virus-KG verwendet. Die aus V2A-Stahl bestehende Trennsäule von 1,60 m Länge besaß eine lichte Weite von 8 mm und war mit 39,2 g stationärer Phase gefüllt, bei der 20% Siliconöl DC 703 auf Sterchamol aufgebracht waren. Die Bodenzahl wurde nach LITTLEWOOD[5] bestimmt und betrug

$N = 797$ (berechnet für D_4)
$N = 798$ (berechnet für Anisol)
$N = 838$ (berechnet für Naphthalin).

(Die Abhängigkeit der Zahl der theoretischen Böden vom Retentionsvolumen ist bekannt[8].) Als Detektor diente eine Gow-Mac-Wärmeleitfähigkeitsmeßzelle mit einer Ansprechzeit von 1 sec. Der Heizstrom für diese Zelle betrug 150 Milliamp. Säule und Zelle befanden sich in einem Luftthermostaten, der bei 125° C gehalten wurde und dessen Temperaturschwankungen kleiner als ± 0,2° C waren. Die Anzeige und Aufzeichnung der Meßwerte übernahm ein 2,5 mV-Kompensograph der Siemens & Halske AG, dessen Papiervorschub auf 300 mm/Std eingestellt wurde. Als Trägergas diente Wasserstoff mit der Strömungsgeschwindigkeit 5,0 l/Std. Die Proben wurden mit einer Injektionsspritze in einen mit Silicongummi abgedichteten heizbaren Probengeber eingespritzt.

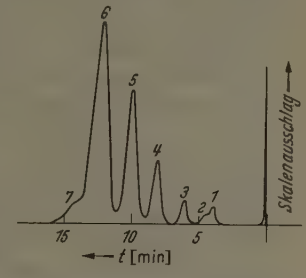


Abb. 1. Gaschromatogramm des bis 175° C siedenden Anteiles (A) des Gemisches von Cyclosiloxanen, das bei der Cohydrolyse von Dimethyldichlorsilan und Methylhydrodichlorsilan entsteht; Säule DC 703, Temperatur 125° C

In dieser Apparatur wurden nun die oben angeführten Fraktionen A und B aufgetrennt (Abb. 1 und 2). Wir fanden

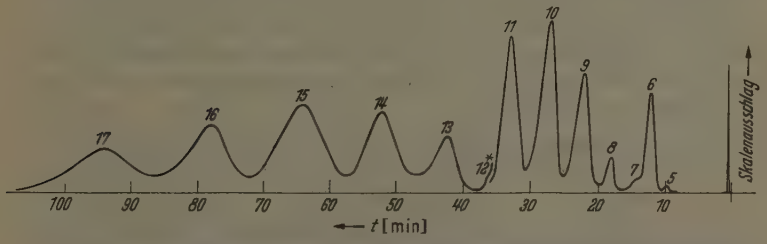


Abb. 2. Gaschromatogramm der oberhalb 175° C siedenden, bei der Cohydrolyse von Dimethyldichlorsilan und Methylhydrodichlorsilan entstehenden Cyclosiloxane (B); Säule DC 703, Temperatur 125° C. * An dieser Stelle wurde die Empfindlichkeit des Kompensationsschreibers verdoppelt

17 Bestandteile, deren korrigierte und auf Anisol bezogene relative Retentionsvolumina bestimmt wurden. Als Hauptbestandteil konnten wir auf Grund des Retentionsvolumens, aber auch durch absichtliche Zugabe einer einwandfrei gekennzeichneten Probe zu den Fraktionen das D_4, $[(CH_3)_2SiO]_4$ (IV), feststellen. Es entspricht der Substanz 6 in den Abb. 1 und 2. Der Bestandteil 5 stimmt nach dem Retentionsvolumen mit der störenden Verunreinigung im betriebsmäßig hergestellten D_4 überein. Es war damit bewiesen, daß diese Verunreinigung durch Cohydrolyse von Dimethyldichlorsilan

(I) mit Methylhydrodichlorsilan (VII) entstand und daß sie eine oder mehrere Si-H-Bindungen enthielt. Vier weitere Verbindungen konnten, da wir entsprechende einwandfrei gekennzeichnete, auf andere Weise dargestellte Proben der Substanzen in den Händen hatten, identifiziert werden. Die Substanz 1 (Abb. 1) erwies sich als D_3. Die Substanz 2 (Abb. 1) war D_4^H (VIII). Die Verbindung, die sich durch die Zacke 11 (Abb. 2) bemerkbar machte, stimmte mit D_5 (V) überein, und die Zacke für 17 (Abb. 2) gehörte zum D_6, $[(CH_3)_2SiO]_6$. Durch fraktionierte Destillation mit einer 2-m-Füllkörperkolonne wurden aus dem Cohydrolysat von $(CH_3)_2SiCl_2$ und CH_3HSiCl_2 neben D_4 (Kp. 175° C) noch zwei tiefer siedende Substanzen mit Kochpunkten von 166° C und 154—157° C erhalten.

Vergleiche ergaben, daß die bei 166° C siedende Substanz sich mit der im betrieblich hergestellten D_4 zu 0,02—0,2% enthaltenen störenden Verbindung deckte. Der für die Störung verantwortliche Bestandteil 5 in den beiden Gaschromatogrammen besaß also einen Siedepunkt von 166° C.

Gleichzeitig wurde festgestellt, daß diese Komponente in Mengen von über 0,05% im D_4 die Polymerisate zur Vernetzung bringt und die Verarbeitung der Produkte beträchtlich erschwert. Mengen von mehr als 0,2% machen eine Verwertung des Produktes praktisch unmöglich.

Neben dem Heptamethylcyclotetrasiloxan, das kurz als D_3D^H bezeichnet werden soll (da es aus drei D- und einer D^H-Einheit besteht), können sich bei der Cohydrolyse von Dimethyldichlorsilan und Methylhydrodichlorsilan auch Hexamethylcyclotetrasiloxan ($D_2D_2^H$) und 1,1,3,5,7-Pentamethylcyclotetrasiloxan (DD_3^H) bilden. Für diese Verbindungen wurden die Siedepunkte aus den bei uns für Cyclosiloxane ermittelten B.P.N.-Werten (boiling point numbers nach KINNEY[3]) berechnet[4] und mit den bei der Destillation der cyclischen Anteile gefundenen Kochpunkten verglichen.

Tabelle 1. *Berechnete und gefundene Siedepunkte einiger Cyclosiloxane*

Substanz	Kurzbezeichnung	Substanz-Nr. in den Abb. 1 u. 2	KP berechnet °C	KP gefundener Fraktionen °C
Tetramethylcyclotetrasiloxan	D_4^H	2	138	134,5
Pentamethylcyclotetrasiloxan	DD_3^H	3	149	—
Hexamethylcyclotetrasiloxan	$D_2D_2^H$	4	160	154—7
Heptamethylcyclotetrasiloxan	D_3D^H	5	169	166
Octamethylcyclotetrasiloxan	D_4	6	177	175

Die berechneten Siedepunkte stimmten mit denen von Fraktionen einigermaßen (siehe Tab. 1) überein, die sich bei der Destillation durch Haltepunkte bemerkbar gemacht hatten. Es durfte also vermutet werden, daß es sich bei den Fraktionen jeweils um die Substanzen $D_2D_2^H$ bzw. D_3D^H handelte. Zum Beweis berechneten wir die Logarithmen der gaschromatographisch gefundenen Retentionsvolumina V_R° und trugen sie

gegen die berechneten Molgewichte auf. Nach JAMES u. MARTIN[2] liegen dabei die Punkte für Substanzen, die der gleichen homologen Reihe angehören, auf einer Geraden. Wenn es sich bei den strittigen Verbindungen also wirklich um die vermuteten Homologen handelte, mußten die als Funktion der Molgewichte aufgetragenen Logarithmen der Retentionswerte auf einer Geraden liegen, da ja dann die homologe Reihe Tetra-, Penta-, Hexa-, Hepta-, Octamethylcyclotetrasiloxan vorlag (Abb. 3). Die Abb. 3 zeigt, daß das nicht in die homologe Reihe gehörende D_3 erwartungsgemäß herausfällt, während die Anwesenheit der vermuteten homologen Verbindungen durch das Auftreten der Geraden bewiesen ist.

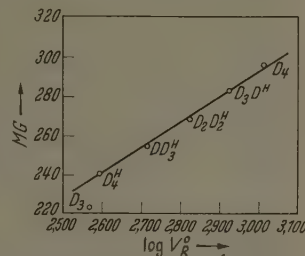


Abb. 3. Molgewichte einiger Methylcyclotetrasiloxane gegen log V_R^o; Säule DC 703, Temperatur 125 °C

Damit ist festgestellt, daß in manchen Ansätzen des Siliconkautschuk-Zwischenproduktes D_4 das bei der Verarbeitung störende Heptamethylcyclotetrasiloxan tatsächlich in Mengen von 0,02—0,2% vorkommen kann. Nach dessen Beseitigung waren die Verarbeitungsschwierigkeiten behoben.

Um die übrigen unbekannten Bestandteile der Abb. 1 und 2 zu identifizieren, die vermutlich Cyclopentasiloxan- und Cyclohexasiloxan-Derivate waren, bestimmten wir das Retentionsvolumen von D_5^H [1,3,5,7,9-Pentamethylcyclopentasiloxan,

$(CH_3HSiO)_5$].

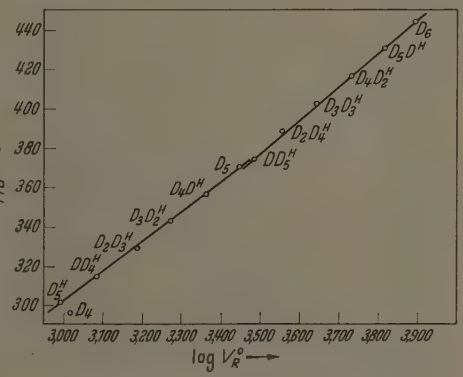


Abb. 4. Molgewichte einiger Methylcyclopenta- und Methylcyclohexasiloxane gegen log V_R^o; Säule DC 703, Temperatur 125° C

Dieses trugen wir zusammen mit dem Retentionsvolumen des D_5 in ein MG/log V_R^o-Diagramm ein. Durch die beiden so gewonnenen Punkte zogen wir eine Gerade. Waren in den Fraktionen 1 und 2 auch die homologen Glieder zwischen D_5^H und D_5, nämlich Hexa-, Hepta-, Octa- und Nonamethylcyclopentasiloxan, enthalten, mußten auch deren Logarithmen für die Retentionsvolumina auf dieser Geraden liegen. Dies ist (Abb. 4) der Fall.

Tabelle 2

Substanz	Formel	Kurzbezeichnung	Nr. in Abb. 1 u. 2		Literatur-Nr.	KP (°C) bei 760 mm Hg	KP (°C) berechnet	V_R° (ml)	V_{rel}° Bezugssubstanz Anisol $V_{rel}^\circ = 1{,}00$
Hexamethylcyclotrisiloxan	$[(CH_3)_2SiO]_3$	D_3	1	bekannt	6	134	132,2	367*	0,30*
1,3,5,7-Tetramethylcyclotetrasiloxan	$[CH_3HSiO]_4$	D_4^H	2	bekannt	10	134,5	138	392*	0,32*
1,1,3,5,7-Pentamethylcyclotetrasiloxan	$[(CH_3)_2SiO][CH_3HSiO]_3$	DD_3^H	3	**	—	—	149	517	0,42
Hexamethylcyclotetrasiloxan	$[(CH_3)_2SiO]_2[CH_3HSiO]_2$	$D_2D_2^H$	4	**	—	154—7	160	667	0,54
Heptamethylcyclotetrasiloxan	$[(CH_3)_2SiO]_3[CH_3HSiO]$	D_3D^H	5	**	—	166	169	833	0,68
Octamethylcyclotetrasiloxan	$[(CH_3)_2SiO]_4$	D_4	6	bekannt	6	175	177,1	1033	0,84
1,3,5,7,9-Pentamethylcyclopentasiloxan	$[CH_3HSiO]_5$	D_5^H	—	bekannt	10	168,7	172,9	983	0,80
1,1,3,5,7,9-Hexamethylcyclopentasiloxan	$[(CH_3)_2SiO][CH_3HSiO]_4$	DD_4^H	7	nicht bekannt	—	—	—	1217	0,99
Heptamethylcyclopentasiloxan	$[(CH_3)_2SiO]_2[CH_3HSiO]_3$	$D_2D_3^H$	8	nicht bekannt	—	—	—	1533	1,24
Octamethylcyclopentasiloxan	$[(CH_3)_2SiO]_3[CH_3HSiO]_2$	$D_3D_2^H$	9	nicht bekannt	—	—	—	1867	1,52

Nonamethylcyclopentasiloxan	$[(CH_3)_2SiO]_4[CH_3HSiO]$	D_4D^H	10	nicht bekannt	—	—	—	2283	1,85
Decamethylcyclopentasiloxan	$[(CH_3)_2SiO]_5$	D_5	11	bekannt	[6]	210	214,9	2783	2,26
1,1,3,5,7,9,11-Heptamethylcyclohexasiloxan	$[(CH_3)_2SiO][CH_3HSiO]_5$	DD^H_5	12	nicht bekannt	—	—	—	3050	2,47
Octamethylcyclohexasiloxan	$[(CH_3)_2SiO]_2[CH_3HSiO]_4$	$D_2D^H_4$	13	nicht bekannt	—	—	—	3617	2,93
Nonamethylcyclohexasiloxan	$[(CH_3)_2SiO]_3[CH_3HSiO]_3$	$D_3D^H_3$	14	nicht bekannt	—	—	—	4417	3,58
Decamethylcyclohexasiloxan	$[(CH_3)_2SiO]_4[CH_3HSiO]_2$	$D_4D^H_2$	15	nicht bekannt	—	—	—	5400	4,38
Undecamethylcyclohexasiloxan	$[(CH_3)_2SiO]_5[CH_3HSiO]$	D_5D^H	16	nicht bekannt	—	—	—	6550	5,31
Dodecamethylcyclohexasiloxan	$[(CH_3)_2SiO]_6$	D_6	17	bekannt	[6]	245	248	7933	6,42
Naphthalin	$C_{10}H_8$					217,9		6968	5,65
Anisol	$C_6H_5OCH_3$					153,8		1234	1,00

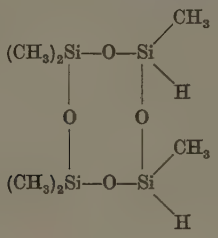
V_g° berechnet für Anisol = 143 ml · g^{-1}

* Die Auftrennung von D_3 und D_4^H gelingt besser bei tieferer Temperatur, z.B. bei 90° C.

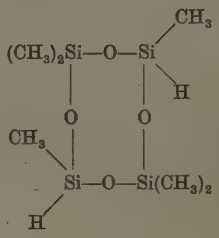
** Nach Fertigstellung dieser Arbeit erfuhren wir anläßlich des Internationalen Symposiums über Makromolekulare Chemie in Moskau, Juni 1960, daß die Verbindungen DD_3^H, $D_2D_2^H$ und D_3D^H von N. N. Sokolov dargestellt worden sind[1]. Die von Sokolov angegebenen Siedepunkte gelten jedoch für 50 bzw. 20 mm Hg.

Die Substanzen 7, 8, 9, 10 und 11 sind damit bekannt. Für die nun noch verbleibenden Verbindungen 12—17 wurden die Logarithmen der berechneten Retentionsvolumina in derselben Weise aufgetragen (Abb. 4) und dadurch, da uns die Verbindung 17 als D_6 bekannt war, die Anwesenheit von Hepta-, Octa-, Nona-, Deca- und Undecamethylcyclohexasiloxan festgestellt.

In Tab. 2 sind die Daten der untersuchten, zum Teil in der Literatur noch nicht beschriebenen Verbindungen zusammengefaßt. Die Substanzen ohne Siedepunktsangabe wurden nocht nicht rein isoliert. Sie sind in den oben beschriebenen Gemischen lediglich gaschromatographisch festgestellt worden. Die genaue Konstitution ist nicht in jedem Falle angegeben, da wir z. B. bei $D_2D_2^H$ nicht entschieden haben, ob bei der Hydrolyse die isomere Form a oder b oder beide Formen entstehen:



a



b

Für die Bezeichnung der Retentionswerte verwendeten wir die Symbole V_R°, V_{rel}° und V_g°. Dabei bedeutet V_R° das effektive Retentionsvolumen (bei dem das Totvolumen berücksichtigt wurde), V_{rel}° das relative effektive Retentionsvolumen entsprechend der Beziehung

$$V_{rel}^\circ = \frac{V_R^\circ}{V_{Standard}^\circ}$$

und V_g° das korrigierte Retentionsvolumen je Gramm der stationären Phase. Korrekturen wurden einmal für den Druckabfall in der Säule und im Strömungsmesser, dann für die Retentionszeit und schließlich für das Gewicht der stationären Phase vorgenommen (siehe auch [8]).

Zusammenfassung

Bei der Herstellung von Siliconkautschuk verursachte eine uns nicht bekannte Komponente im Ausgangsmaterial Octamethylcyclotetrasiloxan Schwierigkeiten. Es traten bei der Polymerisation mitunter unerwünschte Vernetzungen auf. Gaschromatographisch wurde festgestellt, daß das Vorprodukt Dimethyldichlorsilan noch Methylhydrodichlorsilan enthielt. In dem aus einem solchen Dimethyldichlorsilan hergestellten

Octamethylcyclotetrasiloxan fanden wir ebenfalls gaschromatographisch zwischen 0,02 und 0,2% einer uns nicht bekannten Substanz, die an Silicium gebundenen Wasserstoff aufwies. Die gleiche Substanz konnte durch Cohydrolyse der beiden Chlorsilane neben anderen cyclischen Verbindungen dargestellt und isoliert werden. Ihr Retentionsvolumen wurde unter anderem an der Verteilungsflüssigkeit Siliconöl DC 703 bestimmt. Trug man die Logarithmen der Retentionsvolumina dieser cyclischen Verbindungen als Funktion des Molgewichtes auf, so zeigte sich, daß es sich bei dem störenden Bestandteil um Heptamethylcyclotetrasiloxan handelte. An Modellgemischen wurde festgestellt, daß diese Verbindung die D_4-Polymerisation tatsächlich stört.

Auf die gleiche Weise konnte eine Reihe anderer, bisher noch nicht beschriebener Cyclosiloxane mit Si-H-Bindungen in dem Cohydrolysat aus $(CH_3)_2SiCl_2$ und CH_3HSiCl_2 festgestellt werden. In einer Tabelle sind die effektiven und relativen Retentionsvolumina von 18 Cyclosiloxanen angegeben.

Bei mehreren dieser Verbindungen sind diese gaschromatographischen Kennzahlen die ersten gemessenen physikalisch-chemischen Daten, da die Mehrzahl der Methylhydrocyclosiloxane noch nicht in reiner Form isoliert worden ist.

Literatur

[1] Internationales Symposium über Makromolekulare Chemie, Moskau, Juni 1960 (Redakt. Prof. S. A. Rogowina): Chemie u. Technologie der Polymeren. S. 30. — Vgl. Sokolov, N. N.: Ž. obšč. Chim. **29**, 248 (1959). — [2] James, A. T., u. A. J. P. Martin: Biochemic. J. **50**, 679 (1952); vgl. diese Z. **142**, 449 (1954). — [3] Kinney, C. R.: J. Amer. chem. Soc. **60**, 3032 (1938). — [4] Köhne, R.: Unveröffentlichte Dissertation. — [5] Littlewood, A. B.: Gas-Chromatography 1958, Butterworths Sci. Publ., London 1958. — [6] Patnode, W., u. D. F. Wilcock J. Amer. chem. Soc. **68**, 358 (1946). — [7] Price, F. P.: J. Amer. chem. Soc. **69**, 2600 (1947). — [8] Rotzsche, H.: diese Z. **175**, 342 (1960). — [9] Sauer, R. O., W. J. Scheiber u. S. D. Brewer: J. Amer. chem. Soc. **68**, 962 (1946). — [10] Sokolov, N. N., K. A. Andrianov u. S. M. Akimova: Ž. obšč. Chim. **26**, 933 (1956); vgl. Chem. Abstr. **50**, 14782 (1956). — [11] Stock, A., u. C. Somiesky: Ber. dtsch. chem. Ges. **52**, 713 (1919).

Dr. H. Rotzsche, Institut für Silikon- und Fluorkarbonchemie, Radebeul-Dresden, Stalinstr. 35

Institut für Organische Chemie der Technischen Hochschule Karlsruhe

Systematische Identifizierung von Estern im Weinaroma

II. Mitteilung zur systematischen Identifizierung verdampfbarer organischer Substanzen*

Von

ERNST BAYER und LEONORE BÄSSLER

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 13. Dezember 1960)

In einer früheren Arbeit ist gemeinsam mit REUTHER u. KUPFER[4] ein systematischer Arbeitsgang für die Identifizierung gaschromatographisch trennbarer Substanzen vorgeschlagen worden. Diese Methode ist damals am Beispiel eines ätherischen Öls angewendet worden. Es ist dargelegt worden, daß nur eine Kombination verschiedener Methoden mit der Gaschromatographie als Trennmethode eine sichere Aussage über die Zusammensetzung eines Mehrkomponentengemisches zuläßt.

Das Prinzip der systematischen Identifizierung beruht darauf, daß man zunächst ein Gaschromatogramm der gesamten Mischung und daraufhin die sogenannten Differenzchromatogramme ausführt. Bei diesen Differenzchromatogrammen werden Substanzen mit gleichen funktionellen Gruppen durch gruppenspezifische Reagentien in schwerlösliche, nicht flüchtige Derivate übergeführt, so daß deren Banden im Differenzchromatogramm fehlen und dadurch zunächst die Verbindungsklasse der einer Bande zugehörigen Substanz erkannt wird. Die schwerflüchtigen Derivate — z. B. die 2,4-Dinitrophenylhydrazone von Ketonen bzw. Aldehyden — können nun papierchromatographisch aufgetrennt werden und somit neben dem gaschromatographisch erhaltenen Retentionsvolumen eine weitere physikalische Größe, der R_f-Wert, zur sicheren Identifizierung herangezogen werden. Über die Anwendung dieser Ausscheidungsanalyse zur Erkennung von Aldehyden, Ketonen, Alkoholen und Säuren ist berichtet worden[4]. Offen blieb die systematische Identifizierung von Estern.

Unsere Untersuchungen über das Weinaroma[2], das sich zu einem wesentlichen Teil aus Estern zusammensetzt, veranlaßten uns, auch für Ester einen systematischen Arbeitsgang aufzufinden.

Da Ester als solche keine charakteristischen Derivate bilden, beruhen alle bisherigen Verfahren zur Esteridentifizierung auf einer Spaltung in die Säure und den Alkohol. Meist wird die Säure selbst nachgewiesen und

* I. Mitteilung: BAYER, E., G. KUPFER u. K.-H. REUTHER, diese Z. 164, 1 (1958).

bestimmt — z. B. durch acidimetrische Titration — oder deren Derivate — z. B. die Hydroxamsäure-eisen(III)-Komplexe[5] —. Wenn nun verschiedene Ester in einem Mehrkomponentensystem vorliegen, läßt sich nach der Spaltung selbst bei Nachweis und Bestimmung aller entstehenden Alkohole und Säuren schwer eine Zuordnung treffen, welcher Alkohol nun ursprünglich an welche Säure gebunden war. Beim Weinaroma sind die Verhältnisse noch dadurch kompliziert, daß sowohl Alkohole als auch Säuren in freier Form vorkommen und somit eine Zuordnung der nach der Spaltung auftretenden Komponenten zueinander noch schwieriger ist.

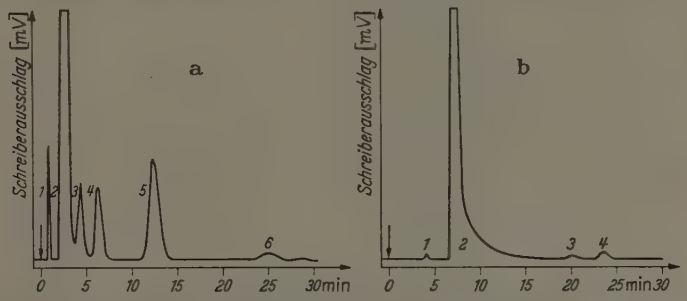


Abb. 1 a und b. Trennung des mit Pentan-Diäthyläther (1:1) erhaltenen Weinextraktes aus Morio-Muskat-Wein, Geilweilerhof. a Säule: 20% Dinonylphthalat auf Kieselgur, 2 m, T = 120° C, Gasdurchfluß: 100 ml H_2/min. b Auftrennung des Substanzgemisches der Bande 2 im Chromatogramm 1 a an einer 2 m-Säule mit 20% Polyäthylenglykol 4000 auf Kieselgur (0,2—0,3 mm ⌀); T = 100° C; Gasdurchfluß: 100 ml H_2/min Gas-Chromatograph: Fa. Rubarth u. Co., Hannover. Die einzelnen Substanzen: Abb. 1 a: *1* Luft, *2* Diäthyläther, Äthanol und Ameisensäureäthylester, *3* Essigsäureäthylester, *4* i-Butanol, *5* i-Amylalkohol, *6* Essigsäure-n-amylester. Abb. 1 b: *1* Luft, *2* Diäthyläther, *3* Ameisensäureäthylester, *4* Äthanol

Am Beispiel einer Fraktion eines Weinextraktes sei der Arbeitsgang zur Trennung und Identifizierung von Estern erläutert. In Abb. 1 sind zwei unter den angegebenen Bedingungen ausgeführte Gaschromatogramme eines mittels Äther/Pentan (1:1) erhaltenen Extraktes aus Morio-Muskat-Wein (Geilweilerhof, 1958) wiedergegeben. Die den einzelnen Banden zukommenden Substanzen werden präparativ aufgefangen und die Infrarotspektren aufgenommen. An Hand der charakteristischen Carbonylbande im Gebiet von 1735—1750 cm^{-1} (vgl. Infrarotspektrum in Abb. 2) kann bei drei Substanzen auf das Vorliegen von Estern geschlossen werden. Andere Substanzen mit Carbonylfrequenzen konnten in der betrachteten Fraktion nicht anwesend sein, da in jüngeren Weinen keine freien Aldehyde bzw. niederen Ketone vorkommen. Die bei der Weinbereitung zugesetzte schweflige Säure bzw. deren Salze binden quantitativ die niederen Aldehyde und Ketone zu den entsprechenden Anlagerungsprodukten der schwefligen Säure, die nicht mehr mit Äther/Pentan extrahiert werden können. Erst bei älteren Weinen, bei denen die im

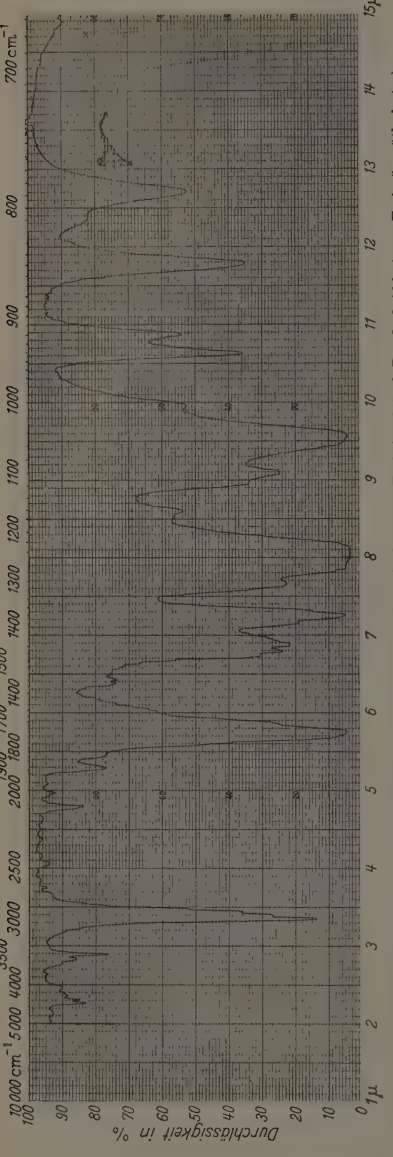


Abb. 2. Infrarotspektrum der gaschromatographisch präparativ aufgefangenen Fraktion 3 (vgl. Bande 3 Abb. 1a = Essigsäureäthylester)

Gleichgewicht vorhandene, freie schweflige Säure langsam oxydiert wird, können Aldehyde wiederum in Ätherextrakten nachgewiesen werden. Wir haben früher darauf hingewiesen[2], daß der sogenannte Firngeschmack älterer Weine auf das Freiwerden von Aldehyden aus den geschmacklosen Schwefligsäureadditionsverbindungen zurückzuführen ist. — Auch Carbonsäuren konnten in dem obigen Chromatogramm nicht auftreten, da schon Ameisensäure und Essigsäure unter den angegebenen Bedingungen eine wesentlich größere Retentionszeit als 30 min aufweisen müßten. Daß es sich bei den drei genannten Verbindungen tatsächlich um Ester handelt, konnte auch durch Umsetzung der Ester mittels Hydroxylamin zu Hydroxamsäuren und deren charakteristischer Rotfärbung mit Eisen-(III)-salzen[5] nachgewiesen werden.

Eine genaue Identifizierung der Ester wird durch zwei charakteristische chromatographische Daten ausgeführt. Die erste Eigenschaft ist das aus dem Gaschromatogramm erhaltene relative Retentionsvolumen. JAMES u. MARTIN[6] sowie RAY[7] haben darauf hingewiesen, daß zwischen dem Logarithmus des Retentionsvolumens und der Kohlenstoffzahl von Verbindungen einer homologen Reihe eine

lineare Abhängigkeit besteht. Diese lineare Abhängigkeit gilt auch bei Estern, wie Abb. 3 zeigt. Mit Ausnahme des ersten Gliedes der Reihe kann es sich bei jeder Kohlenstoffzahl um mindestens zwei verschiedene Ester handeln. Denn sowohl der Essigsäuremethylester als auch der Ameisensäureäthylester haben drei Kohlenstoffatome und unter den angegebenen Bedingungen das gleiche Retentionsvolumen. Die in unserem Beispiel gefundenen Ester weisen nach der Tab. 1 eine Gesamtkohlenstoffzahl von 3,4 und 7 auf. Da die Gesamtkohlenstoffzahl aus dem relativen Retentionsvolumen eindeutig festgelegt wird, muß nun als zweite Eigenschaft noch die Kohlenstoffzahl einer Komponente des Esters, entweder der Säure oder des Alkohols, bestimmt werden. Durch Subtraktion ergibt sich dann zwangsläufig die Kohlenstoffzahl der anderen Komponente. Wir haben uns für die Identifizierung der Säurekomponente entschieden, die relativ einfach und überaus empfindlich durch papierchromatographische Trennung der Eisen(III)-komplexe der Hydroxamsäuren erfolgen kann. Nach dem von BAYER u. REUTHER[4] beschriebenen Verfahren lassen sich noch etwa 1 μg Hydroxamsäure-eisen(III)-Komplex chromatographisch auf mit Eisen(III)-chlorid imprägniertem Papier (Schl. & Sch. 2043 b) mit Butanol-Dimethylformamid-Wasser (4,5 : 0,5 : 5,0) trennen

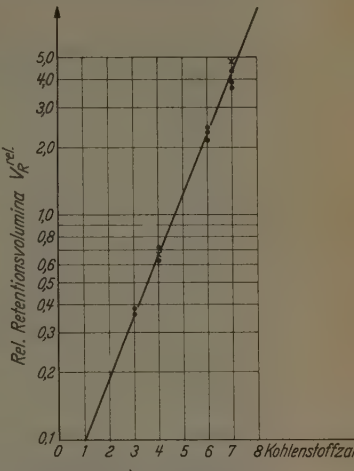


Abb. 3. log-V_R^{rel}-Kohlenstoffzahl-Beziehung für aliphatische Ester. Stationäre Phase: 20% Dinonylphthalat auf Kieselgur (0,2 bis 0,3 mm ⌀). Temperatur 120° C. Chromatographiebedingungen wie bei Abb. 1 a. Bezugssubstanz: Benzol V_R^{rel} = 1,0

Tabelle 1

	V_R^{rel} *	Gesamt-Kohlenstoffzahl	R_f Hydroxamsäure-eisen(III)-Komplex**	Kohlenstoffzahl der Säure	Kohlenstoffzahl des Alkohols
Ameisensäureäthylester	0,36	3	0,22	1	2
Essigsäureäthylester	0,66	4	0,34	2	2
Essigsäure-n-amylester	4,83	7	0,34	2	5

* Chromatographiebedingungen wie bei Abb. 1 a.

** Absteigend chromatographiert mit Butanol-Dimethylformamid-Wasser (4,5:0,5:5,0) (organische Phase) auf $FeCl_3$-imprägniertem Papier (Schl. u. Sch. 2043 b Mgl).

und nachweisen. Für diese papierchromatographische Bestimmung werden die gaschromatographisch aufgetrennten, auch für die IR-Spektren benutzten, Fraktionen verwendet.

Tabelle 2. *Estergehalte einiger Weine*

Weine	Ameisensäure-äthylester	Essigsäureester	Propionsäure-äthylester	Butter-säureester	Valeriansäure-äthylester	Aliphatische Carbonsäuren C_6—C_{10}	Ester aromatischer Carbonsäuren	Zimtsäureester
1953 Morio-Muskat*	++	++	—	—	—	+	+	+++
1955 Morio-Muskat*	++	+++	s.w.	s.w.	s.w.	+	—	++
1955 Riesling*natur	++	+++	s.w.	s.w.	s.w.	++	+	—
1937 Riesling	+	++	s.w.	s.w.	+	++	+++	—
Bad Kreuznach								
1955 Traminer	s.w.	++	s.w.	+	s.w.	+	++	—
1955 Portugieser*	s.w.	+++	s.w.	+++	—	+++	+	—

Die Zeichen bedeuten: s.w. = sehr wenig; + = wenig; ++ = viel; +++ = sehr viel.

* Für die Überlassung dieser Weine danken wir Herrn Prof. Dr. Husfeld, Forschungs-Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof, bestens.

Wie aus der Zusammenstellung in der Tab. 1 entnommen werden kann, sind so zu Substanz 3 (Abb. 1b) Ameisensäure und zu den Substanzen 3 (Abb. 1a) und 6 (Abb. 1a) Essigsäure als Säurekomponenten zugeordnet worden. Demnach sind Substanz 1 und 3 Äthylester der Ameisensäure bzw. Essigsäure und 3 Amylester der Essigsäure. Eine letzte Kontrolle dieses Ergebnisses ist nun durch Vergleich der IR-Spektren der gaschromatographisch getrennten Ester mit reinen Estern möglich. Die IR-Spektren von isolierter und reiner Vergleichssubstanz sind völlig identisch.

Die hier vorgeschlagene Esteridentifizierung beruht somit auf zwei relativ einfachen Arbeitsgängen. Zunächst wird das Mehrkomponentensystem gaschromatographisch getrennt und die einzelnen Fraktionen aufgefangen. Insgesamt werden etwa 0,10 ml Extrakt getrennt. Eine Hälfte der jeweiligen Fraktionen wird für das IR-Spektrum, die andere für die Umsetzung zu Hydroxamsäuren und deren papierchromatographische Trennung benutzt. Die in Abb. 3 wiedergegebene Eichkurve für die log V_R^{rel}-Kohlenstoffzahl-Beziehung gilt für aliphatische Ester bis zu einer Kohlenstoffzahl von 12. Wenn nun aromatische Carbonsäuren oder Phenole als Esterkomponente auftreten, müssen andere Eichkurven verwendet werden.

Es sei hier noch erwähnt, daß die anderen, in den Chromato-

grammen (Abb. 1) erscheinenden Substanzen nach den Ergebnissen der Ausscheidungsanalyse und nach den ebenfalls vermessenen IR-Spektren als Äthanol, n-Propanol, i-Butanol und i-Amylalkohol identifiziert worden sind.

Die Weinextrakte sind an Dinonylphthalat außer bei 120° C auch noch bei 80 und 130° C sowie an der Polyäthylenglykolsäule auch bei 140° C und 160° C chromatographiert worden, um noch die höhersiedenden Verbindungen zu erfassen.

Die hierbei erhaltenen Ergebnisse sind in Tab. 2 für verschiedene Weine zusammengefaßt. Die unterschiedlichen Gehalte an Estern in Abhängigkeit von Jahrgang, Lage, Sorte und Farbe des Weines zeigen die Möglichkeit zur Beurteilung eines Weines mittels der Kombinationsanalyse auf. Die halbquantitativen Angaben in Tab. 2 sind durch Vergleich der Flächen unter den einzelnen Banden nach der Verhältnismethode[1] erhalten worden. Um die charakteristischen Unterschiede übersichtlicher darzustellen, sind einzelne Estergruppen in einer Spalte zusammengefaßt (vgl. Spalten 2, 4, 6—8 in Tab. 2).

Es ist bei allen Weinen augenscheinlich, daß der Gehalt an Ameisensäure- und Essigsäureäthylestern in keiner Korrelation zum Geschmack steht. Bemerkenswert ist, daß nur die Muskat-Weine hohe Gehalte an Zimtsäureestern aufweisen. Im Wein des besseren Jahrgangs (1953) finden sich besonders viele Ester aromatischer Carbonsäuren und in verstärktem Umfang auch Ester aliphatischer Carbonsäuren von C_5—C_{10}. Bemerkenswert erscheint auch der Unterschied zwischen Rotwein (Portugieser) und den Weißweinen. Im Rotwein finden sich ungewöhnlich große Mengen an Buttersäureestern.

Eine kombinierte Analyse mit der Gaschromatographie als Trennmethode vermag offensichtlich in ein Gebiet einzudringen, das bisher nur dem subjektiven Vergleich mit Sinnesorganen vorbehalten geblieben ist.

Zusammenfassung

Es wird eine systematische Identifizierung von Estern in komplizierten Mehrkomponentengemischen angegeben. Die Substanzen werden gaschromatographisch getrennt und von den präparativ isolierten Fraktionen der reinen Ester Infrarotspektren aufgenommen, sowie nach Umwandlung zu Hydroxamsäuren und Papierchromatographie der Eisen-(III)-chelate die Säurekomponente des jeweiligen Esters bestimmt. Aus dem gaschromatographisch erhaltenen Retentionsvolumen wird mittels der log V_R^{rel}-Kohlenstoffzahl-Beziehung die Gesamtkohlenstoffzahl des Esters bestimmt und nach Subtraktion der papierchromatographisch erhaltenen Kohlenstoffzahl der Säurekomponente die Alkoholkomponente identifiziert.

Das Verfahren wird zur Analyse der Ester des Weinaromas angewendet.

Literatur

[1] Bayer, E.: Gaschromatographie, S. 49. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1959. — [2] Bayer, E.: Vitis **1**, 34, 93 (1957). — [3] Bayer, E., G. Kupfer u. K. H. Reuther: diese Z. **164**, 1 (1958). — [4] Bayer, E., u. K. H. Reuther: Angew. Chem. **68**, 698 (1956); vgl. diese Z. **158**, 298 (1957). — [5] Feigl, F.: Qualitative Analysis by Spot Tests. Elsevier, Amsterdam 1946. — [6] James, A. T., u. A. J. P. Martin: Biochemic. J. **50**, 679 (1952); vgl. diese Z. **142**, 449 (1954). — [7] Ray, N. H.: J. appl. Chem. **4**, 21, 81 (1954).

Priv.-Doz. Dr. E. Bayer, Institut für organische Chemie der Technischen Hochschule Karlsruhe i. B., Englerstr. 11

V. Aufklärung der Konstitution organischer Verbindungen sowie des Ablaufs organisch-chemischer Reaktionen mit chemischen und physikalischen Methoden

Max-Planck-Institut für Biochemie, München

Strukturaufklärung organischer Verbindungen nach chemischen und physikalischen Methoden

Von
HEINZ DANNENBERG

Mit 18 Textabbildungen

(Eingegangen am 28. Oktober 1960)

Eine der wichtigsten Aufgaben des organischen Chemikers ist die Aufklärung der Struktur einer Verbindung; sei es die Bestimmung der Konstitution eines isolierten Naturstoffes, sei es die Aufklärung oder Sicherung der Konstitution einer durch Synthese erhaltenen Verbindung. Diese Aufgabe ist naturgemäß nicht immer gleich leicht zu lösen. Die Schwierigkeiten wachsen meist mit zunehmender Molekülgröße und Kompliziertheit des Baues der Verbindung. Allgemeine Richtlinien zur Strukturaufklärung einer organischen Verbindung lassen sich nicht angeben, doch wird im allgemeinen, nachdem man sich von der Einheitlichkeit der Substanz vergewissert hat, der erste Schritt, die Aufstellung der *Summenformel* durch Analyse und Bestimmung des Molekulargewichts sowie die Charakterisierung der Verbindung sein. Daran anschließen werden sich die Bestimmung funktioneller Gruppen und des Grundgerüstes, die Festlegung der Stellung von funktionellen Gruppen und Substituenten und schließlich die Klärung stereochemischer Fragen und Einzelheiten des Feinbaus. Als Resultat dieser Bemühungen wird man zur *Strukturformel* der Verbindung gelangen.

Die zur Strukturaufklärung verwendeten Methoden haben sich in den 100 Jahren seit Beginn der Strukturchemie (KEKULÉ 1859[27]) sehr verändert. Bis in die ersten Jahrzehnte unseres Jahrhunderts hinein sind die Arbeiten über die Bestimmung der Konstitution einer Verbindung gekennzeichnet durch die fast ausschließliche Anwendung chemischer Methoden. Der klassische „chemische Weg" ist bestimmt durch die Darstellung von Derivaten, durch den Umbau und den Abbau, mit dem

Bestreben aus den Ergebnissen und aus dem Verlauf der Reaktionen Aussagen über Atomgruppen oder Teile des Moleküls und aus der Kombination der Ergebnisse schließlich die Strukturformel selbst zu erhalten. Physikalische Methoden dienten der Charakterisierung der Stoffe; sie waren und sind in dieser Hinsicht Hilfsmittel, die nicht zu unterschätzen sind, denn nur auf diesem Wege ist über die Beschreibung, die wir mit unseren Sinnen ohne Hilfsmittel vornehmen können, hinaus eine ausreichende Charakterisierung möglich, eine Charakterisierung, die zum Vergleichen und Zuordnen unbedingt notwendig ist.

Die zunehmende Möglichkeit der vergleichenden Untersuchung durch die wachsende Zahl der Verbindungen mit bekannter Struktur, die Fortschritte in der Erkenntnis über den Bau organischer Verbindungen und die Fortschritte auf physikalischem Gebiet haben vor allem in den letzten 3 Jahrzehnten, häufig zuerst auf rein empirischer Grundlage, Zusammenhänge zwischen Konstitution und bestimmten physikalischen Eigenschaften ergeben, die andererseits auch Aussagen bei Verbindungen unbekannter Struktur gestatten. Viele Probleme der Strukturaufklärung können heute durch physikalische Methoden schneller, eindeutiger und häufig auch mit kleineren Substanzmengen (ein Faktor, der bei der ganzen Entwicklung eine nicht zu übersehende Rolle spielt) gelöst werden; manche Probleme der Strukturchemie sind durch physikalische Methoden überhaupt erst einer Lösung zugänglich geworden. Bei der Anwendung physikalischer Methoden zur Strukturermittlung muß man sich aber der Grenzen der Methodik und der Aussagen bewußt sein. „Physikalische Messungen allein sind kein vollständiger Ersatz für die Isolierung und sorgfältige Charakterisierung reiner chemischer Individuen“[28].

Wenn man davon absieht, daß alle physikalischen Methoden der Charakterisierung einer Substanz dienen können und damit für die Identifizierung wichtig sind, lassen sich die heute zur Verfügung stehenden physikalischen Methoden in drei Gruppen einteilen[29]:

1. Zur Strukturermittlung nur in Sonderfällen von Bedeutung (wichtig zur Charakterisierung und Identifizierung):

Schmelzpunkt bzw. Siedepunkt
Löslichkeit
Dampfdruck
Dichte
Lichtbrechungsvermögen
Adsorptionsverhalten (Chromatographisches Verhalten).

2. Aussagen über Größe, Gestalt oder Struktur gestatten:

Molekulargewicht
Massenzahl

Verhalten bei Sedimentation und Diffusion
Elektronenmikroskopisches Bild
Elektronenbeugung
Röntgenstrukturanalyse
Oberflächenfilme
Infrarot-(Raman)-Spektrum
Kernresonanz-Spektrum
Dipolmoment (Dielektrizitätskonstante)
Optische Drehung.

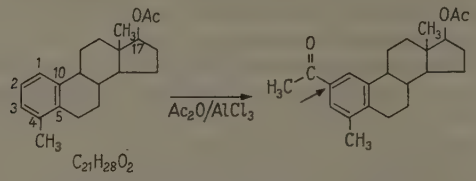
3. Aussagen über Teile oder besondere Gruppen gestatten:
Infrarot-(Raman)-Spektrum
Ultraviolett-Spektrum
Dissoziationsfähigkeit
(elektrophoretisches Verhalten, Leitfähigkeitsvermögen)
Redox-Verhalten
Polarographisches Verhalten
Magnetochemisches Verhalten
Elektronenresonanz
Rotationsdifferenzen
Rotationsdispersion
Reaktionskinetisches Verhalten.

Es soll hier nicht auf die einzelnen Methoden, ihre Möglichkeiten und und ihre Grenzen bei der Strukturermittlung eingegangen werden.

Genausowenig, wie man allgemeine Richtlinien über die Wahl chemischer Reaktionen zur Strukturermittlung aufstellen kann, kann man allgemeine Richtlinien über die Wahl physikalischer Methoden geben. In beiden Fällen hat sich die Wahl zu richten nach den Gegebenheiten, nach der Stoffklasse, zu welcher die Verbindung gehört, deren Struktur zu klären ist, nach den Substanzmengen, die zur Verfügung stehen und nach den Fragen, auf welche man im einzelnen eine Antwort haben will.

Wie sich die Methoden der Strukturermittlung in den letzten Jahrzehnten geändert haben, läßt sich am besten erkennen an Beispielen der Literatur. Es sei versucht zu zeigen: 1. wie physikalische Methoden einen chemischen Weg ersetzen können, 2. wie physikalische Methoden die Richtung für den chemischen Weg weisen können, 3. wie die Kombination chemischer und physikalischer Methoden zum Erfolg führt, 4. wie chemische Methoden das Grundgerüst, physikalische Methoden aber die Verteilung bestimmter Gruppen und 5. wie chemische Methoden Bausteine, physikalische Methoden aber das Gerüst oder den Aufbau bestimmen können.

1. Bei der Durchführung von Reaktionen im Verlaufe der Strukturaufklärung einer unbekannten Substanz oder bei der Darstellung einer Verbindung im Rahmen einer Synthese ist es wichtig zu wissen, ob eine Reaktion den gewünschten Verlauf genommen hat oder welchen Verlauf die Reaktion nahm. Die Bestimmung der Zusammensetzung gibt sehr häufig keine eindeutige Entscheidung; mit einer geeigneten physikalischen Methode oder mit der Kombination verschiedener Methoden kann eine Klärung schnell möglich sein. Es gibt hierfür unzählige Beispiele der verschiedensten Art. Ein Beispiel der synthetischen Chemie aus einem eigenen Arbeitsgebiet sei herausgegriffen[11] (Abb. 1):



$C_{21}H_{28}O_2$

1. Zusammensetzung: $C_{21}H_{27}O_2 \cdot CO{-}CH_3$

2. UV (Äthanol): 215 nm $\varepsilon = 29000$ subst. Acetophenonspektrum
262 nm $\varepsilon = 15100$

3. IR (KBr):[5,75 μ (OAc)], 5,95 μ konj. $>C=O$

11,17 μ (Typ 1.2.3.5) 2-Stellung

Abb. 1. 2-Acetyl-4-methyl-$\Delta^{1,3,5(10)}$-oestratrienol-(17β)-acetat

Bei der Umsetzung von 4-Methyl-$\Delta^{1,3,5(10)}$-oestratrienol-(17β)-acetat mit Essigsäureanhydrid nach FRIEDEL-CRAFTS entsteht, wenn man in Tetrachloräthan arbeitet, zu 65% eine Acetyl-Verbindung. Daß die Substitution, wie zu erwarten, am aromatischen Ring erfolgt ist, geht aus dem UV-Spektrum (Spektrum eines alkylsubstituierten Acetophenons) und aus der langwelligen Lage (5,95 μ) der Carbonyl-Valenzschwingungsbande des IR-Spektrums hervor. Der Eintritt der Acetylgruppe kann aber in 1-, 2- oder in 3-Stellung erfolgen. Die Entscheidung für die 2-Stellung liefert das IR-Spektrum, denn es zeigt eine γ-Schwingungsbande bei 11,17 μ.

Bei aromatischen Verbindungen ist die Lage der γ-Schwingungsbanden („out-of-plane" Deformationsschwingungsbanden) abhängig von der Zahl der am aromatischen Ring stehenden Wasserstoffatome und ihrer Stellung zueinander und damit vom Substitutionstyp[3]. Vergleicht man die Lage der γ-Schwingungsbanden bei den in Frage kommenden Steroiden (Abb. 2), so sieht man, daß die getroffene Zuordnung eindeutig ist, denn die entsprechenden isomeren 1-Acetyl- bzw. 3-Acetyl-

Verbindungen müßten, da zum Substitutionstyp 1.2.3.4 gehörig, eine Bande im Bereich von 12,22—12,54 μ aufweisen[11,12].

2. Bei der Isolierung von Wirkstoffen aus natürlichem Material werden häufig nur sehr geringe Mengen reiner Substanz erhalten. Zur Strukturermittlung wird man dann bestrebt sein, einerseits mit der zur Verfügung stehenden Menge ein Maximum an Aussagen zu erhalten, andererseits die Substanz für chemische Reaktionen möglichst sinnvoll einzusetzen. Ein instruktives Beispiel ist hier die Ermittlung der Struktur

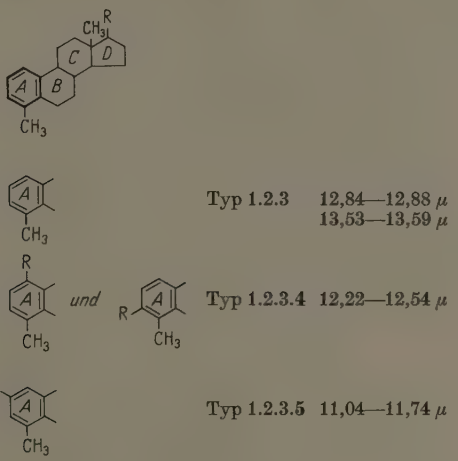


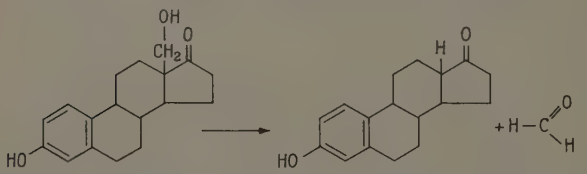
Abb. 2. γ-Schwingungsbanden und Substitutionstyp bei Ring A-benzoiden Steroiden

einer aus Schwangeren-Harn isolierten zuerst KC-6A genannten Substanz durch Loke, Marrian u. Watson[20] (Abb. 3). Von dieser Verbindung standen zuerst nur 5,7 mg zur Verfügung, mit denen die Aufstellung einer vorläufigen Strukturformel gelang, die später bestätigt wurde.

Aus der Summenformel $C_{18}H_{22}O_3$, der Festlegung der Sauerstofffunktionen als zwei Hydroxylgruppen (Diacetat), davon eine an einem Benzolring gebunden (UV-Spektrum vom Phenol-Typ), und einer wahrscheinlich in einem Fünfring befindlichen reduzierbaren (s. u.) Ketogruppe (IR-Spektrum Bande bei 5,80 μ), der eine CH_2-Gruppe benachbart ist (IR-Spektrum Bande bei 7,10 μ), wird wahrscheinlich, daß es sich um eine Verbindung handelt, welche dem gleichfalls im Schwangeren-Harn vorkommenden Follikelhormon Oestron nahesteht (Grundkohlenwasserstoff $C_{18}H_{24}$ = Oestratrien). Da sich in der Papierchromatographie die R_f-Werte der Verbindung KC-6A selbst und seines $NaBH_4$-Reduktionsproduktes (Reduktion der Ketogruppe) nicht voneinander

unterscheiden, müssen die ursprünglich vorhandene und die neuentstandene Hydroxylgruppe räumlich sehr nahe stehen. Da andererseits im IR-Spektrum der Substanz KC-6A die „Methylbande" bei 7,27 μ fehlt, ist der Ersatz eines Wasserstoffatoms der angularen Methylgruppe des Oestrons durch eine Hydroxylgruppe sehr wahrscheinlich. Die daraufhin durchgeführte chemische Reaktion liefert den endgültigen Beweis für die Struktur von KC-6A als 18-Hydroxy-oestron: die Behandlung von KC-6A mit Alkali ergibt, wie auch bei anderen primären β-Ketolen gefunden[2], Spaltung in *Formaldehyd*, der in Form eines Derivates

$C_{18}H_{22}O_3$ FP 255—257° $[\alpha]_D$ + 146° 5,7 mg
Diacetat $C_{18}H_{20}O\,(O \cdot COCH_3)_2$: 2 OH
UV (Äthanol): λ_{max} 281 nm, $\varepsilon = 2200$: 1 phenol. OH
IR (KCl): 5,80 μ : $>C=O$ (Fünfring?)
5,80 μ + 7,10 μ : —CO—CH_2—
7,27 μ-Bande fehlt : kein CH_3!
Grundkohlenwasserstoff : $C_{18}H_{24}$ = Oestratrien
Papierchromatographie:
KC-6A : R_f 0,5
$NaBH_4$-Reduktionsprodukt: : R_f 0,5 2 räumlich nahe OH



18-Hydroxy-oestron = KC-6A — 18-Nor-oestron (Synthese)

Abb. 3. Substanz KC-6A aus Schwangeren-Harn

quantitativ bestimmt wurde, und in *18-Nor-oestron*, dessen Methyläther sich (wie eine spätere Wiederholung der Reaktionen mit mehr Substanz zeigte) als identisch mit dem Methyläther eines synthetisch dargestellten Präparates erwies[19].

Ein anderes Beispiel dafür, wie physikalische Methoden den chemischen Weg weisen können, ist die Strukturermittlung des aus der Kulturflüssigkeit einer Streptomyces-Art isolierten Antibioticums *Azaserin* durch die Wissenschaftler der PARKE DAVIS COMPANY[14] (Abb. 4).

Azaserin ist eine hellgelbgrüne kristallisierte Verbindung der Zusammensetzung $C_5H_7N_3O_4$. Seine optische Drehung ändert sich beim Übergang von neutraler zu saurer Lösung. Die positive Ninhydrinreaktion spricht für eine α-Aminosäuregruppierung (und zwar, wie die quantitative CO_2-

Bestimmung zeigt, ist nur eine derartige Gruppierung im Molekül vorhanden); sie wird bestätigt durch das IR-Spektrum (Banden bei 3,8, 6,22 und 6,63 μ). Das IR-Spektrum zeigt ferner die Banden einer konjugierten Estergruppe (5,89/5,96 μ und 8,42 μ) und eine sehr auffällige Bande bei 4,66 μ, die einer Azid-, Keten- oder Diazogruppe zukommen

Azaserin $C_5H_7N_3O_4$ hellgelbgrüne Kristalle

$[\alpha]_D$ — 0,5° (p_H 5,18) $\xrightarrow{2n\ HCl}$ $[\alpha]_D$ + 9,7°

Ninhydrin-Reaktion positiv : α-Aminosäure-Gruppe

1 CO_2 = 1 N

IR: 3,8 μ, 6,22 μ u. 6,63 μ : Aminosäure

5,89/5,96 μ und 8,42 μ : konj. Ester-Gruppe

4,66 μ : Azid, Diazo-Gruppe, Keten

UV: (p_H 7,0) 250,5 nm, ε = 19700 : $N_2C(H)-C(=O)-OR$ (Modell)

(0,1 n HCl) — ($N_2\uparrow$) ,,

Beim Ansäuern: $N_2\uparrow$, 16,18% N_2 : 2 N

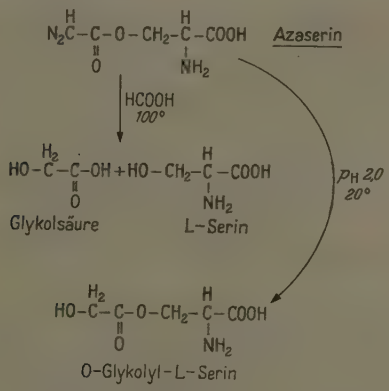


Abb. 4. Azaserin

könnte. Daß es sich um eine Diazogruppierung vom Typ des Diazoessigesters handelt, zeigt das UV-Spektrum: in neutraler Lösung ist es identisch mit demjenigen des Diazoessigesters, beim Ansäuern verschwindet die Absorptionsbande, gleichzeitig entwickelt sich Stickstoff, dessen quantitative Bestimmung 1 N_2 je Molekül entspricht. Alle Daten zusammen genommen führten zur Aufstellung der Strukturformel des Azaserins als *O-Diazoacetoxy-Serin*, die dann chemisch bestätigt wurde durch das Ergebnis der sauren Hydrolyse: beim Erhitzen mit Ameisensäure entstehen *Glykolsäure* und *L-Serin*, bei p_H 2 (20°C) entsteht aus Azaserin *O-Glykolyl-L-Serin*.

3. Bei den beiden Beispielen 18-Hydroxy-östron und Azaserin handelt es sich um Verbindungen, deren Struktur auf bekannte Grundstrukturen

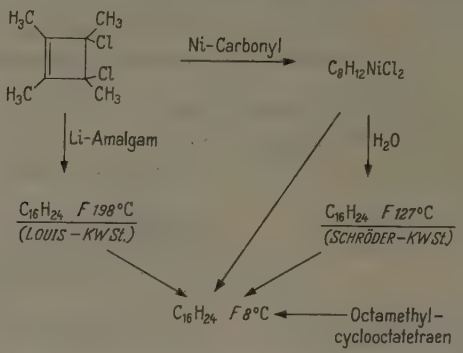


Abb. 5. Bildung der isomeren Octamethyl-tricyclooctadiene

oder Bausteine zurückgeführt werden konnte. Die Fruchtbarkeit der Kombination chemischer und physikalischer Methoden wird aber besonders deutlich bei Verbindungen mit noch unbekanntem Grundgerüst. Ein Beispiel aus der synthetischen Chemie sei herausgegriffen:

	$C_{16}H_{24}$ FP 198°C	$C_{16}H_{24}$ FP 127°C
UV	190—193° nm, log $\varepsilon = 3{,}83$ (Cyclohexan) (F)	
IR	5,94 μ (F in sehr gespanntem Ring)	
NMR	nur 2 Banden gleicher Intensität (2 Arten H)	
Dipolmoment	0,64 D	0

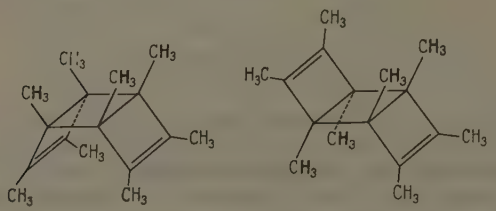


Abb. 6. Octamethyl-tricyclooctadiene I

die Strukturermittlung der isomeren *Octamethyl-tricyclooctadiene* von CRIEGEE u. Mitarb.[10] (Abb. 5—7). Die Konstitutionsermittlung stieß hier auf Schwierigkeiten, da manche klassische Reaktionen anomal verliefen oder ganz ausblieben.

Aus 3,4-Dichlor-1,2,3,4-tetramethyl-cyclobuten entsteht bei der Behandlung mit Li-Amalgam ein Kohlenwasserstoff der Zusammen-

setzung $C_{16}H_{24}$ (Louis-Kohlenwasserstoff). Das gleiche Ausgangsmaterial läßt sich durch Behandeln mit Nickelcarbonyl in einen Komplex $C_8H_{12}NiCl_2$ umwandeln, der beim Kochen seiner wäßrigen Lösung zu einem isomeren Kohlenwasserstoff $C_{16}H_{24}$ (Schröder-Kohlenwasserstoff) führt. Bei der thermischen Zersetzung ergeben beide Kohlenwasserstoffe ebenso wie der Nickelkomplex und auch Octamethyl-cyclooctatetraen einen weiteren isomeren, aber flüssigen Kohlenwasserstoff $C_{16}H_{24}$ (FP 8°C).

Das physikalische (Abb. 6) und das chemische Verhalten (Abb. 7) des Louisschen und des Schröderschen Kohlenwasserstoffs, deren Struktur in diesem Zusammenhang interessiert und von denen also Beziehungen zum

	$C_{16}H_{24}$ FP 198°C	$C_{12}H_{24}$ FP 127°C
Ozon	Diozonid	Diozonid
	$\downarrow H_2$	$\downarrow H_2$
	$C_{16}H_{24}O_4$ FP 292°C	$C_{16}H_{28}O_4$ FP 161°C
UV	keine Absorption	292 nm, $\log \varepsilon = 1{,}22$ (Methanol)
IR	kein OH, kein C=O	5,90 μ (>C=O)
NMR	nur 2 Banden gleicher Intensität (2 Arten von H)	—

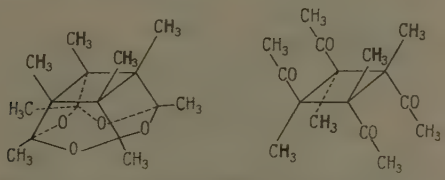


Abb. 7. Octamethyl-tricyclooctadiene II

Cyclobuten als auch zum Cyclooctatetraen bestehen, ergeben, daß beide Kohlenwasserstoffe außerordentlich ähnlich gebaut sein müssen. Sie zeigen gleiches Verhalten im UV, im IR und in der Kernresonanz. Sie haben isolierte Doppelbindungen (UV), die in einem sehr gespannten Ring liegen müssen, wie sich aus der kurzwelligen Lage der C=C-Valenzschwingung bei 5,94 μ ergibt. Das Kernresonanz-Spektrum (NMR-Spektrum), aus dem man bekanntlich entnehmen kann, wie viele Sorten von Wasserstoffatomen in einer Verbindung vorhanden sind und mit welcher Anzahl jede Sorte vertreten ist, weist nur zwei Banden gleicher Intensität auf, was für einen hochsymmetrischen Bau spricht; die Auswertung ergibt, daß in beiden Kohlenwasserstoffen zwölf allylständige und zwölf paraffinische Wasserstoffe vorhanden sind. Die beiden Kohlenwasserstoffe unterscheiden sich aber in ihren Symmetrieeigenschaften, denn der Louissche Kohlenwasserstoff zeigt ein Dipolmoment von 0,64 D, während der Schrödersche Kohlenwasserstoff das Dipolmoment 0

hat. Die Ergebnisse der physikalischen Untersuchungen sprechen für die Struktur von *Octamethyl-tricyclooctadienen*, für welche die *syn*-Form (Louis-Kohlenwasserstoff) und die *anti*-Form (Schröder-Kohlenwasserstoff) möglich ist, und diese Strukturen werden durch die chemische Untersuchung bestätigt (Abb. 7).

Beide Kohlenwasserstoffe geben sowohl kristallisierte Monoozonide als auch Diozonide. Die Hydrierung der Diozonide führt zu isomeren Verbindungen $C_{16}H_{24}O_4$. Die sich von der *anti*-Form, also vom Schröderschen Kohlenwasserstoff ableitende Verbindung ist in Übereinstimmung mit ihrem UV- und IR-Spektrum ein Tetraketon. Die sich von der *syn*-Form, also vom Louisschen Kohlenwasserstoff ableitende Verbindung

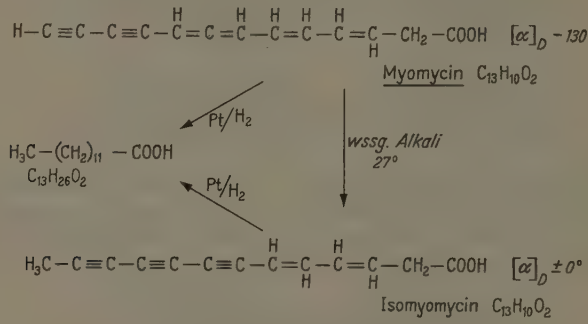


Abb. 8. Myomycin-Isomyomycin

zeigt dagegen im UV keine Absorption und im IR keine „Carbonylbanden" aber starke „Acetalbanden" (C-O-Banden) im Bereich zwischen 8—10 μ; das Kernresonanz-Spektrum weist auch wiederum nur zwei Banden gleicher Intensität auf. Da außerdem weder Hydroxylgruppen noch peroxydischer Sauerstoff vorhanden sind, müssen alle vier Sauerstoffe ätherartig gebunden sein. Die einzig mögliche Erklärung ist die bemerkenswerte Struktur eines Tetraketals, dessen Entstehung aus der *syn*-Form eines Octamethyl-tricyclo-octadiens verständlich ist.

4. In anderen Fällen ist wohl das Kohlenstoffgrundgerüst auf chemischem Wege bestimmt worden, aber es gelang nur durch physikalische Methoden, wesentliche Teile oder Gruppierungen zu erkennen oder ihre Reihenfolge innerhalb des Grundgerüstes festzulegen.

Besonders eindrucksvoll ist in dieser Hinsicht das aus der Kulturflüssigkeit der Boden-Actinomycete *Nocardia acidopholus* isolierte, antibiotisch wirksame *Myomycin*, welches von CELMER u. SOLOMONS[8] in seiner Struktur aufgeklärt wurde. Die Verbindung ist strukturchemisch in verschiedener Hinsicht interessant.

Das *Myomycin* (Abb. 8) hat die Zusammensetzung $C_{13}H_{10}O_2$ und ist optisch aktiv. Die katalytische Hydrierung ergibt die Fettsäure *Tridecylsäure*; damit sind zugleich die Sauerstoffunktionen als Carboxylgruppe und auch das Kohlenstoffgerüst festgelegt. Bei der Behandlung des Myomycins mit wäßrigem Alkali wandelt sich das Myomycin in das isomere, aber optisch inaktive *Isomyomycin* um, das seinerseits bei der Hydrierung auch Tridecylsäure liefert.

Wie der Unterschied von 16 H-Atomen zwischen Myomycin und Isomyomycin und ihrem Hydrierungsprodukt Tridecylsäure zeigt,

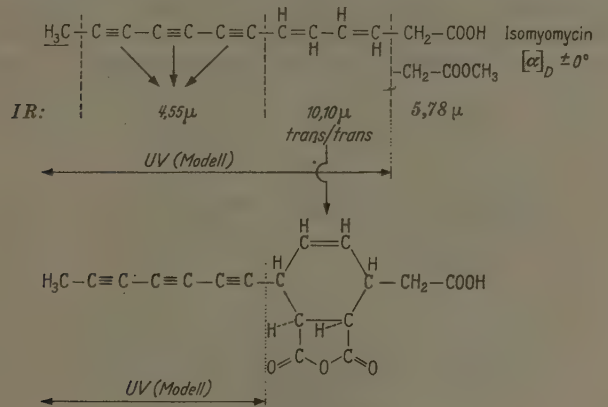


Abb. 9. Isomyomycin

müssen beide Verbindungen eine Reihe ungesättigter Gruppen enthalten. Wegweisend für die Struktur des Myomycins war die Aufklärung der Konstitution von Isomyomycin (Abb. 9).

Durch das Ergebnis der Methylgruppen-Bestimmung nach Kuhn-Roth und durch das Vorhandensein einer Bande bei 5,78 μ im IR-Spektrum des Methylesters sind die beiden Enden des Moleküls als Methyl- und als CH_2COOH-Gruppe festgelegt. Die Bande bei 4,55 μ im IR-Spektrum des Isomyomycins selbst läßt auf zweifach substituierte Acetylengruppen schließen, eine Bande bei 10,10 μ auf eine *trans-trans*-Dien-Gruppierung, die auch verantwortlich ist für die Bildung eines Dien-Additionsproduktes mit Maleinsäureanhydrid. Die UV-Spektren dieses Adduktes und des Isomyomycins und der Vergleich mit UV-Spektren entsprechender Modellverbindungen führen zur Aufstellung einer Strukturformel des Isomyomycins, die später dann auch von Bohlmann u. Viehe[4] durch Synthese bewiesen wurde.

Die Bestimmung der ungesättigten Gruppen und ihre Festlegung im Kohlenstoffgerüst beim Myomycin nun wurde ausschließlich aus den IR- und UV-Spektren erschlossen (Abb. 10). Auch das Myomycin enthält an einem Ende die Essigsäure-Gruppierung (IR: Bande bei 5,78 μ), am anderen Ende aber keine Methylgruppe, sondern eine Acetylengruppe (IR: Banden bei 3,05 und 4,90 μ); ferner enthält es weiterhin eine zweifach substituierte Acetylengruppe (IR: Bande bei 4,55 μ), die, wie sich aus einem Hinweis aus dem UV-Spektrum ergibt (Bandenabstand 1900 cm^{-1}), zur ersten Acetylengruppe in Konjugation steht, und eine Allengruppierung (IR: Bande bei 5,18 μ). Die Allengruppierung ist verantwortlich für die durch die optische Aktivität erkennbare Asymmetrie des Myomycin-Moleküls (das erste Naturprodukt mit einer derartigen Gruppierung) und für die Struktur des UV-Spektrums, das sich durch die Überlagerung

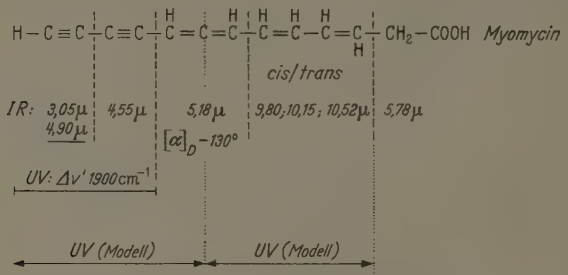


Abb. 10. Myomycin

zweier, durch die Allengruppierung an einer Konjugation verhinderter, chromophorer Systeme zu deuten ist. Aus dem UV-Spektrum des Myomycins und dem Vergleich mit Spektren von Modellverbindungen läßt sich auch auf das Vorhandensein einer Dien-Struktur schließen, die aber im Gegensatz zum Isomyomycin nicht *trans-trans*-Anordnung hat, sondern *cis-trans*-Anordnung (IR: Banden bei 9,80, 10,15 und 10,52 μ). Damit ist die Struktur des Myomycins festgelegt, offen ist lediglich nun noch, ob das Dien-System *cis-trans*- oder *trans-cis*-Anordnung hat.

Durch die Auswertung des IR-Spektrums gelang auch eine gewisse sterische Zuordnung beim *Sexuallockstoff des Seidenspinners*, dessen Struktur durch Hydrierung, oxydativen Abbau und aus dem spektralen Verhalten als *Hexadecadien-(10,12)-ol-(1)* (Abb. 11) erkannt wurde[6]. Infolge des konjugierten Doppelbindungssystems kann es vier isomere Verbindungen geben: *trans-trans*-Form, *trans-cis*-Form, *cis-trans*-Form und *cis-cis*-Form. Auf Grund der Banden bei 10,18 μ und 10,56 μ des IR-Spektrums kann die Auswahl *trans-cis*-Form oder *cis-trans*-Form getroffen werden[7,9]. Die Entscheidung zwischen diesen beiden Formen,

die nur durch eine stereospezifische Synthese möglich ist, fiel kürzlich zugunsten der 10-*trans*-12-*cis*-Form[14a].

5. Schließlich sei auf ein Beispiel eingegangen, bei welchem einige Bausteine des Gesamtmoleküls durch chemischen Abbau bekannt waren, aber ein integrierender Bestandteil sowie die Gesamtstruktur völlig ungeklärt waren. Es ist die Strukturermittlung des *Vitamins* B_{12}. Von

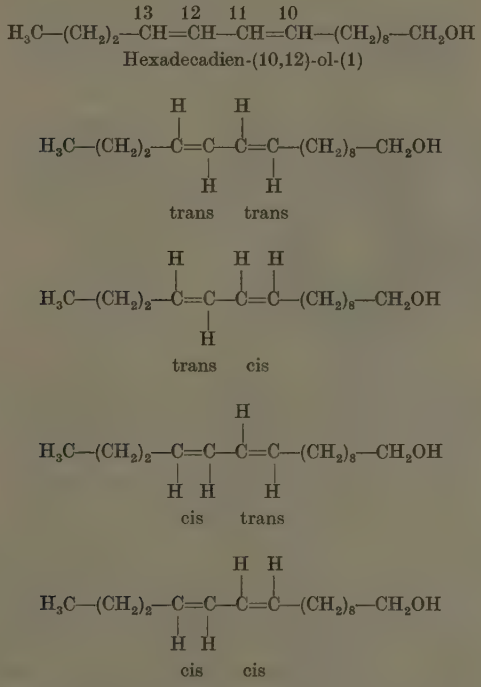


Abb. 11. Hexadecadien-(11,12)-ol-(1) und seine geometrischen Isomere

dieser Verbindung, die zuerst 1948 von Folkers u. Mitarb.[23] aus Leber isoliert worden war, kannte man 1954[13] (Abb. 12) die Zusammensetzung $C_{63}H_{90}N_{14}O_{14}PCo$ (wobei die C- und H-Zahlen nicht ganz festlagen); man wußte, daß das Kobalt darin dreiwertig ist und an ihm eine Cyangruppe gebunden ist. Als Hydrolyseprodukte wurden je 1 Mol *5,6-Dimethyl-benzimidazol* und *Phosphorsäure* erhalten, welche Bestandteile größerer auch isolierter Hydrolyseprodukte waren, nämlich von *1α-D-Ribofurano-syl-5,6-dimethyl-benzimidazol* und seinem *3'-Phosphat*, also einem Nucleosid bzw. einem Nucleotid. Ferner waren als Hydrolyseprodukte

isoliert worden D-*1-Aminopropanol-(2)*, welches mit der Phosphorsäuregruppe des Nucleotids verestert sein sollte, und eine das wesentliche

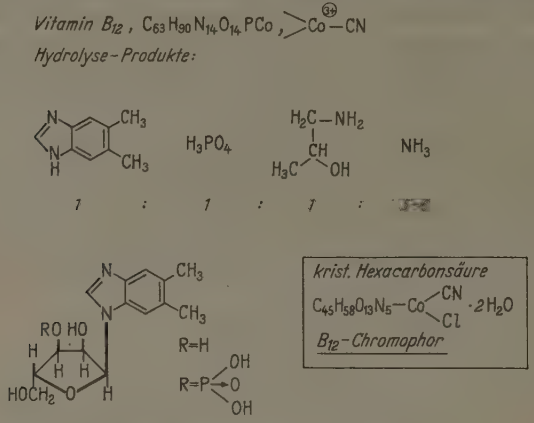


Abb. 12. Hydrolyseprodukte von Vitamin B_{12}

Chromophore System und das Kobalt enthaltende *Hexacarbonsäure*, die noch den größten Teil des Vitamin B_{12}-Moleküls darstellte und deren Carboxylgruppen ursprünglich an *Ammoniak* (5—6 Mole NH_3) gebunden

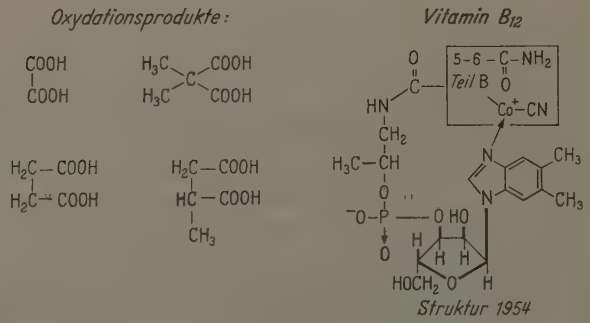


Abb. 13. Oxydationsprodukte von Vitamin B_{12} und Strukturvorschlag 1954

waren. Als Oxydationsprodukte des Vitamins B_{12} waren gefaßt worden: *Oxalsäure*, *Dimethylmalonsäure*, *Bernsteinsäure* und *Methylbernsteinsäure* (Abb. 13). Aus diesen Befunden war eine Strukturformel aufgestellt worden[13] (Abb. 13), in welcher der größte Teil (Teil B) noch unbekannt war. Für diesen Teil B waren sowohl Hinweise für eine polypyrrolartige

Struktur (z.B. ein Porphyrin) als auch für eine Struktur vom Terpentyp vorhanden.

Die Aufklärung des Hexacarbonsäureteiles und des gesamten Vitamin B_{12}-Moleküls erbrachte 1955 die Röntgenstrukturanalyse durch HODGKIN, WHITE u. Mitarb.[16]. Als Grundskelet der Hexacarbonsäure wurde ein bis dahin unbekanntes porphyrinähnliches Ringsystem, das *Corin-System*, erkannt, in dessen Mitte sich das Kobaltion befindet (Abb. 14 und 15) die Seitenketten konnten zugeordnet, die Verknüpfung mit den bereits bekannten Teilen konnte gesichert und schließlich die vollständige Strukturformel des Vitamins B_{12} (Abb. 15) aufgestellt werden.

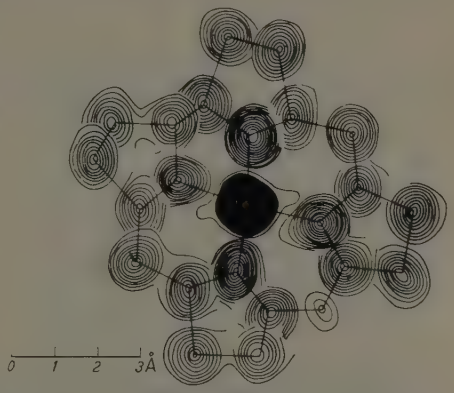


Abb. 14. Ausschnitt der Elektronendichteverteilung der „Hexacarbonsäure" (Corin-Gerüst) nach D. C. HODGKIN[16]

Zum Abschluß sei kurz ein Gebiet gestreift, welches von der Chemie hinüberreicht in die Molekularbiologie: das Gebiet der Proteine, Nucleinsäuren und Nucleoproteide. Hier steht die Strukturermittlung erst noch am Beginn einer Entwicklung, die gekennzeichnet ist durch die Zusammenarbeit von Chemie und Physik, die ganz verschiedene Bereiche dieser großen Moleküle erschließen.

Bei Proteinen unterscheidet man verschiedene Strukturbereiche: die *Primärstruktur* umfaßt die Zahl und Art der Aminosäurebausteine und ihre Reihenfolge; die *Sekundärstruktur* ist gekennzeichnet durch die in sich durch Wasserstoffbrücken zusammengehaltene Anordnung der Polypeptidkette; unter der *Tertiärstruktur* versteht man die Anordnung der stabilisierten Ketten im Raum, die Zusammenfaltung der Proteine. Bei Nucleoproteiden, wie den Viren, kommt noch die *Quartärstruktur* hinzu, d.h. die Art des Zusammentretens von Nucleinsäuren und Protein bzw. dessen Untereinheiten[17].

Nur die Bestimmung der Primärstruktur erfolgt auf chemischem Wege; die Bestimmung der anderen Strukturen ist durch physikalische Methoden gekennzeichnet.

Bisher sind alle Strukturelemente bei ein und demselben Protein noch nicht aufgeklärt worden. Bei einigen Proteinen ist die Primärstruktur bekannt, wie zuerst beim *Insulin* durch SANGER[24] bestimmt, dann auch bei der *Ribonuclease*[15]; über die Sekundärstruktur macht die

α-Schraube von PAULING u. COREY[21] Aussagen. Beim *Myoglobin* schließlich kennt man durch die Arbeiten von KENDREW[18] mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse den dreidimensionalen Aufbau (Abb. 16), die Lage des

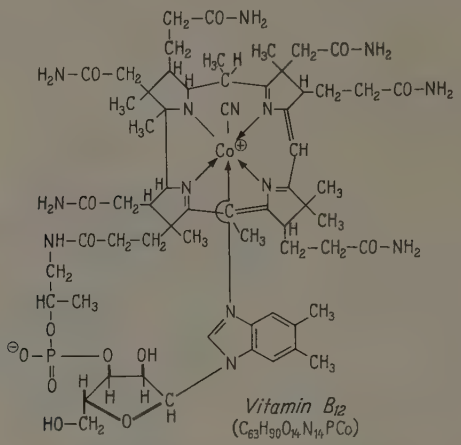


Abb. 15. Strukturformel von Vitamin B_{12}

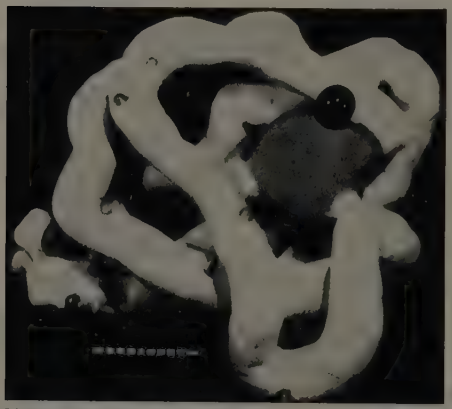


Abb. 16. Modell des Myoglobinmoleküls: Polypeptidkette (weiß) und Hämgruppe (graue Scheibe). Die Kügelchen auf der Polypeptidkette geben die Stellung der verschiedenen schweren Atome an, die zur Aufklärung der Struktur eingeführt wurden (nach[18])

Hämmoleküls und die Zusammenfaltung des Proteinmoleküls, das ein Molekulargewicht von 17000 hat und aus 153 Aminosäuren besteht, aber man kennt noch nicht die Primärstruktur also die Reihenfolge der Aminosäuren. Ähnlich liegen die Verhältnisse beim Hämoglobin, von

welchem man durch die Arbeiten von PERUTZ u. Mitarb.[22] ein Modell über den dreidimensionalen Aufbau hat, von welchem man die Aminosäurenreihenfolge durch die Arbeiten von BRAUNITZER u. Mitarb.[5] aber erst zum Teil kennt und zwar erst 70 Sequenzen von annähernd 290.

Von allen Virusarten (Viren sind Nucleoproteide) ist die Aufklärung der Gesamtstruktur am weitesten fortgeschritten bei einem pflanzlichen Virus, dem Tabakmosaikvirus[23]. Dieses Virus hat ein Molekulargewicht von 40 Millionen. Aus dem Ergebnis der chemischen und physikalischen Untersuchungen ergibt sich für dieses Nucleoproteid als Quartärstruktur ein Modell von FRANKLIN, CASPAR u. KLUG[17] (Abb. 17), in welchem um den spiralig gewundenen Ribosenucleinsäurestrang vom Molukelargewicht um 2 Millionen 2100 Protein-Untereinheiten vom Molekulargewicht 17400 angeordnet sind. Diesem Modell: Nucleinsäurestrang, der von einer Proteinhülle umgeben ist, entspricht auch das elektronenmikroskopische Bild (Abb. 18) von durch milde Behandlung mit Alkali partiell abgebauten Viruspartikeln: man erkennt, wie bei teilweiser Entfernung der Proteinhülle, also der Protein-Untereinheiten in der Mitte des Virusstäbchens der Nucleinsäurestrang freigelegt wird wie der Docht in einer Kerze[26]. In neuester Zeit ist von SCHRAMM u. Mitarb.[1] auch die Primärstruktur der Protein-Untereinheiten des Tabakmosaikvirus aufgeklärt worden, d. h. es ist die Reihenfolge der 157 Aminosäurereste bestimmt worden. Ganz unbekannt ist aber noch die Reihenfolge der etwa 6000 Nucleotidreste des Ribosenucleinsäurestranges, wie es bisher überhaupt noch nicht möglich ist, die Nucleotidsequenz in einer hochmolekularen Nucleinsäure zu bestimmen.

Abb. 17. Tabakmosaikvirus-Modell. Um den im Innern spiralenförmigen Nucleinsäurestrang angeordnete Protein-Untereinheiten nach [17]

Die vollständige Aufklärung der Struktur von Proteinen, Nucleinsäuren und Nucleoproteiden dürfte nicht nur unsere Erkenntnisse über

den Aufbau dieser Verbindungen und ihre Eigenschaften erweitern, sie dürfte uns auch ein tieferes Verständnis für biologische, physiologische und pathologische Vorgänge geben.

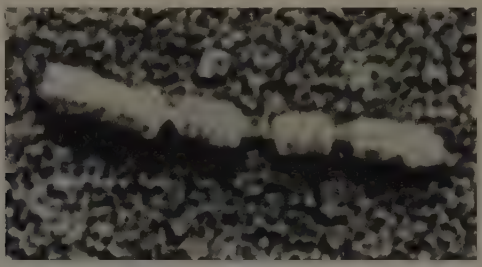


Abb. 18 TMV-Virus mit Proteinlücken, Vergrößerung 1:75000 (nach[28])

Sicher werden noch weitere physikalische Methoden Bedeutung für die Strukturermittlung organischer Verbindungen erlangen; auch diese werden die Arbeit erleichtern und Zeit sparen helfen. Chemische und physikalische Wege der Strukturermittlung sollen und dürfen sich aber nicht trennen; sie müssen einander parallel laufen. Je mehr Berührungspunkte sie miteinander haben, desto fruchtbarer wird das Ergebnis sein.

Literatur

[1] Anderer, F. A., H. Uhlig, E. Weber u. G. Schramm: Nature (London) **186**, 922 (1960). — [2] Barton D. H. R., u. P. de Mayo: J. chem. Soc. (London) **1954**, 887. — [3] Bellamy, L. J.: The Infra-Red Spectra of Complex Molecules, 2. Aufl., 1958. — s. a. Dannenberg, H., U. Schiedt u. W. Steidle: Z. Naturforsch. **8b**, 269 (1953). — [4] Bohlmann, F., u. H. G. Viehe: Chem. Ber. **87**, 712 (1954). — [5] Braunitzer, G., V. Rudloff, K. Hilse, B. Liebold u. R. Müller: Hoppe Seylers Z. physiol. Chem. **320**, 283 (1960). — [6] Butenandt, A., R. Beckmann, D. Stamm u. E. Hecker: Z. Naturforsch. **14b**, 283 (1959). — [7] Butenandt, A., E. Hecker u. H. G. Zachau: Chem. Ber. **88**, 1185 (1955). — [8] Celmer, W. D., u. I. A. Solomons: J. Amer. chem. Soc. **74**, 1870, 2245 3838, (1952); **75**, 1372, 3430 (1953). — [9] Celmer, W. D., u. I. A. Solomons: J. Amer. chem. Soc. **75**, 3430 (1953). — [10] Criegee, R., u. G. Louis: Chem. Ber. **90**, 417 (1957). — Criegee, R., u. G. Schröder: Liebigs Ann. Chem. **623**, 1 (1959). — Criegee, R., G. Schröder, G. Maier u. H.-G. Fischer: Chem. Ber. **93**, 1553 (1960). — [11] Dannenberg, H., D. Dannenberg-von Dresler u. T. Köhler: Chem. Ber. **93**, 1989 (1960). — [12] Dannenberg, H., C. H. Doering u. D. Dannenberg-von Dresler: Hoppe Seylers Z. physiol. Chem. **317**, 174 (1959). — [13] Folkers, K., u. D. E. Wolf: (Zusammenfassung) Vitamins and Hormones **12**, 1 (1954). — [14] Fusari, S. A., R. P. Frohardt, A. Ryder, T. H. Haskell, D. W. Johannessen, C. C. Elder u. Q. R. Bartz: J. Amer. chem. Soc. **76**, 2878 (1954). — Fusari, S. A., T. H. Haskell, R. P. Frohardt, u. Q. R. Bartz: J. Amer. chem. Soc. **76**, 2881 (1954). — [14a] Hecker, E.: XI. International Congress of Enthymology, Wien, 17.—25.8.1960.— [15] Hirs, C. H. W., W. H. Stein u. S. Moore: Symposium on Protein structure. (London) **1958**, 211. — [16] Hodgkin, D. C. (Zusammenfassung): Fortschr. Chem. org. Naturstoffe (Wien): **15**, 167 (1958). — s. a. Johnson, A. W., u. A. Todd:

Vitamins and Hormones **15**, 1 (1957). — [17] KENDREW, J. C.: Federation Proceedings **18**, 740 (1959). — [18] KENDREW, J. C., R. E. DICKERSON, B. E. STRANDBERG, R. G. HART, D. R. DAVIES, D. C. PHILLIPS u. V. C. SHORE: Nature (London) **185**, 422 (1960). — [19] LOKE, K. H., G. F. MARRIAN, W. S. JOHNSON, W. L. MEYER u. D. D. CAMERON: Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) **28**, 214 (1958). — [20] LOKE, K. H., G. F. MARRIAN u. E. J. D. WATSON: Biochemic. J. **71**, 43 (1959). — [21] PAULING, L., R. B. COREY u. H. R. BRAINSON: Proc. nat. Acad. Sci. **37**, 205 (1951). — [22] PERUTZ, M. F., M. G. ROSSMANN, A. F. CULLIS, H. MUIRHEAD, G. WILL u. A. C. T. NORTH: Nature (London) **185**, 416 (1960). — [23] RICKES, E. L., N. G. BRINK, F. R. KONIUSZY, T. R. WOOD u. K. FOLKERS: Science, N. Y. **107**, 396 (1948). — s. a. SMITH, E. L.: Nature (London) **161**, 638 (1948). — [24] RYLE, A. P., F. SANGER, L. F. SMITH u. R. KITAL: Biochemic. J. **60**, 541 (1955). — [25] SCHRAMM, G.: Ann. Rev. Biochem. **27**, 101 (1958). — [26] SCHRAMM, G., G. SCHUMACHER u. W. ZILLIG: Z. Naturforsch. **10b**, 481 (1955). — [27] STAAB, H. A.: Angew. Chem. **70**, 37 (1958). — [28] WOODWARD, R. B.: Angew. Chem. **72**, 651 (1960).

[29] Zusammenfassungen über physikalische Methoden sind zu finden in: MÜLLER, E. (HOUBEN-WEYL): Methoden der organischen Chemie, Bd. III, Teil 1 und 2, Stuttgart 1955. — BRAUDE, E. A., u. F. C. NACHOD: Determination of Organic Structures by Physical Methods, New York, N.Y., 1955. — Analytical Reviews in Analyt. Chemistry **32**, Heft 5 (1960). — Für einzelne Methoden sei ferner auf folgende Monographien oder Zusammenfassungen hingewiesen: SCHACHMANN, H. K.: Ultracentrifugation in Biochemistry, New York, London (1959). — HOPPE, W.: Die Röntgenstrukturanalyse als Methode zur Bestimmung der chemischen Konstitution, Angew. Chem. **69**, 659 (1957); vgl. diese Z. **162**, 362 (1958). — TURNIT, H. J.: Über monomolekulare Filme an Wassergrenzflächen und über Schichtfilme, Fortschr. Chem. org. Naturstoffe (Wien) **4**, 347 (1945). — BELLAMY, L. J.: The Infra-Red Spectra of Complex Molecules, London, New York 1958 (2. Aufl.). — ROBERTS, J. D.: Nuclear Magnetic Resonance, New York, Toronto, London 1959. — GILLAM, A. E., u. E. S. STERN: An Introduction to Electronic Absorption Spectroscopy in Organic Chemistry, London 1958 (2. Aufl.). — BREZINA, M., u. P. ZUMAN: Polarography in Medicine, Biochemistry and Pharmacy, New York 1958. — INGRAM, D. J. E.: Free Radicals as Studied by Electron Spin Resonance, London 1958. — DJERASSI, C.: Optical Rotatory Dispersion (Applications to Organic Chemistry), New York, Toronto, London 1960.

Prof. Dr. H. DANNENBERG, Max-Planck-Institut für Biochemie, München 15, Goethestraße 31

Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung, Institut für Chemie, Heidelberg

Aufklärung von Reaktionsabläufen mit Hilfe der Protonenresonanz

Von

V. FRANZEN

(Eingegangen am 5. Dezember 1960)

Bei Untersuchungen über Reaktionsmechanismen muß man vielfach mit Substanzen arbeiten, in denen ein bestimmtes reaktives Zentrum durch Deuterium markiert ist. Bei den Reaktionsprodukten gilt es dann gewöhnlich zwei Fragen zu beantworten:

1. Wieviel Deuterium findet sich in den einzelnen Reaktionsprodukten?

2. An welchem Kohlenstoffatom der deuteriumhaltigen Verbindung ist das Deuterium gebunden.

Zur Beantwortung der *ersten Frage* existieren verschiedene Methoden. Man kann die einzelnen Reaktionsprodukte verbrennen und den Deuteriumgehalt des entstandenen Wassers bestimmen. Diese Methode ist sehr genau aber ziemlich zeitraubend. Einfacher wären rein physikalische Methoden. Hier bietet sich nun einmal die IR-Spektroskopie und zum anderen die Messung der Protonenresonanz an. Die aliphatische C-D-Bindung hat im Bereich um 4,7 μ eine charakteristische Absorptionsbande. Im Protonenresonanz-Spektrum ist, wenn bei üblichen Feldstärken gearbeitet wird, der Deuteriumkern nicht zu erkennen.

Betrachten wir ein konkretes Beispiel. Uns interessierte die Frage der primären Protonenabspaltung aus Triäthylsulfoniumbromid mit Tritylnatrium.

$$(CH_3 \cdot CH_2)_3S^{\oplus}\,Br^{\ominus} + \Phi_3C^{\ominus} \rightarrow CH_2 = CH_2 + S(CH_2CH_3)_2 + \Phi_3CH + Br^{\ominus}$$

Das Triäthylsulfoniumbromid wurde deshalb in den — CH_2-Gruppen vollständig deuteriert. Aus dem Tritylanion entsteht bei der Reaktion Triphenylmethan. Je nachdem ob das Proton aus dem Sulfoniumsalz aus der α- oder β-Stellung abgespalten wird, muß Triphenylmethan-D oder Triphenylmethan-H entstehen. Verlaufen beide Reaktionen nebeneinander, so ergibt sich entsprechend ein Gemisch.

Sowohl im IR-Spektrum als auch im Protonenresonanz-Spektrum absorbiert die aliphatische C-H-Bindung in einem Bereich in dem die aromatischen C-H-Bindungen inaktiv sind. Dieses System eignet sich deshalb besonders gut dazu, die Genauigkeit der Deuteriumanalysen nach beiden Methoden miteinander zu vergleichen. Zu diesem Zweck wurden Mischungen mit verschiedenem Φ_3CH/Φ_3CD Verhältnis hergestellt. Im Falle des IR-Spektrums sollte sich aus der Intensität der Bande bei 4,7 μ der Deuteriumgehalt ergeben. Umgekehrt kann bei der Protonenresonanz aus der Intensität der C-H-Bande auf den Wasserstoffgehalt und aus der Differenz auf den Deuteriumgehalt geschlossen werden. Der Chemical Shift der C-H-Bande gegen Wasser gemessen ist — 3,3. Alle Messungen wurden in Tetrachlorkohlenstoff bei gleicher molarer Triphenylmethan-Konzentration durchgeführt. Zur Kontrolle wurden noch die relativen Intensitäten der variablen Bande zur Bande $C_{arm.}$ — H herangezogen. Die Zahl der Protonen an den aromatischen Kernen blieb ja bei allen Messungen die gleiche, so daß die absolute Höhe der letzen Bande bei allen Messungen die gleiche sein mußte.

Die experimentellen Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle wiedergegeben.

Tabelle

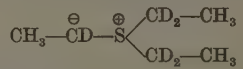
% Φ_s CH	% Φ_s CD	Relative Intensität C-D IR	Relative Intensität C-H N.M.R.
100		—	1
80	20	0,19 ± 0,045	0,82 ± 0,1
70	30	0,31 ± 0,04	0,71 ± 0,08
50	50	0,50 ± 0,03	0,49 ± 0,06
20	80	0,80 ± 0,03	0,2 ± 0,1
	100	1.00	—

Bei der Untersuchung der Protonenresonanz wurde, um die Linienbreite möglichst weitgehend herabzudrücken, die Probe rotiert. Das Lösungsvolumen in der Empfängerwicklung wurde konstant gehalten. Wie man aus der Tabelle erkennt, ist die IR-spektroskopische Bestimmung des Deuteriumgehalts der Deuteriumbestimmung mit Hilfe der Protonenresonanz überlegen. Die Protonenresonanz kann nur zur groben Bestimmung des Deuteriumgehaltes dienen. Sicherlich läßt sich die Genauigkeit dieser Methode noch erhöhen, ohne besonderen Arbeitsaufwand ist jedoch die IR-spektroskopische Bestimmungsmethode besser.

Ich komme jetzt zur Beantwortung der *zweiten Frage*. Die genaue Lokalisierung eines Deuteriumatoms innerhalb einer Molekel läßt sich durch chemischen Abbau durchführen, dieses ist aber ein sehr mühseliges und zeitraubendes Unterfangen. Im IR-Spektrum läßt sich noch die Art der C-D-Bindung erkennen, eine eindeutige Lokalisierung ist aber nur schwerlich möglich. Hier leistet nun die Protonenresonanz ausgezeichnete Dienste. Die Protonenresonanz kommt bekanntlich durch Wechselwirkung eines äußeren Magnetfeldes mit dem magnetischen Moment eines Protons zustande. Der Kernspin des Protons beträgt $^1/_2$. Die Protonen unterliegen nun nicht nur dem Einfluß des äußeren Feldes, sondern zusätzlich tritt noch eine Beeinflussung der benachbarten Kerne durch deren magnetisches Moment ein. Dieses Phänomen wird allgemein als Spin-Spin-Kopplung bezeichnet. Die Stärke der Kopplung wird von der Größe der Kopplungskonstanten J bestimmt. Das Deuteron besitzt nun ebenfalls einen Kernspin, er beträgt 1. Glücklicherweise ist jedoch die Kopplungskonstante J zwischen einem Proton und einem Deuteron innerhalb der H-C-D-Gruppe so klein, daß eine Spin-Spin-Kopplung experimentell nicht zu beobachten ist. Wie schon vorher erwähnt, absorbiert das Deuteron bei gleichen Oscillatorfrequenzen bei ganz anderen Feldstärken als das Proton. Ersetzt man also ein Proton durch ein Deuteron, so hat es im Protonenresonanz-Spektrum die gleiche Folge, wenn man vom Chemical Shift absieht, wie die Substitution eines Protons durch ein anderes Element, das im Kernresonanz-Spektrum keine

Linie gibt. Eine CHD-Gruppe verhält sich bezüglich der Spin-Spin-Kopplung genauso wie eine $\diagup$C-H-Gruppe$\diagdown$.

Darf ich jetzt wieder auf unser konkretes Beispiel zurückkommen. Aus der Analyse des Deuteriumgehalts im Triphenylmethan hatte sich ergeben, daß im Triäthylsulfoniumbromid der Angriff der Base zu 74% an den α-CD_2-Gruppen und nur zu 24% an den Methylgruppen erfolgt. Das intermediär entstehende Ylid kann sich theoretisch auf zweierlei Weise stabilisieren:



α′ β Eliminierung ↙ ↘ Carbenzerfall

$CH_3 \cdot CHD \cdot S \cdot CD_2 \cdot CH_3$ $CH_3 \cdot CD_2 \cdot S \cdot CD_2 \cdot CH_3$

Es kann α′β-Eliminierung eintreten oder es erfolgt Zerfall in ein Carben und Diäthylsulfid. Beide Mechanismen ergeben Diäthylsulfid, die Deuteriumsubstitution im Reaktionsprodukt hängt jedoch von der Art des Mechanismus ab. Nur das auf dem Wege der α′β-Eliminierung gebildete Diäthylsulfid enthält an einem der α-Kohlenstoffatome die Gruppierung CHD. Mit Hilfe der Protonenresonanz kann man damit auf ganz einfachem Wege zwischen beiden Mechanismen — α′β-Eliminierung und Carbenzerfall — unterschieden werden. Die CHD-Gruppe zeigt Spin-Spin-Kopplung mit der benachbarten CH_3-Gruppe. An der Stelle der Absorption der Methylgruppe muß also bei Anwesenheit einer benachbarten CHD-Gruppe ein Doublett auftreten, die Protonenresonanz der CHD-Gruppe muß zum Quartett aufgespalten sein. Sind die α-Kohlenstoffatome dagegen nur mit Deuterium besetzt, so tritt im Bereich der α-Methylengruppen keine Absorption auf, die Absorption der Methylgruppen ist nicht aufgespalten.

Experimentell findet sich nun in unserem Beispiel eine Linienaufspaltung. Damit ist eindeutig bewiesen, daß das intermediär auftretende Ylid nicht auf dem Weg über den Carbenzerfall stabilisiert, sondern daß α′β-Eliminierung erfolgt. Die quantitative Auswertung ist nicht ganz so exakt, zumal ja neben der α′β-Eliminierung die reine β-Eliminierung als Konkurrenzreaktion verläuft. Mit der zuvor genannten Genauigkeit läßt sich immerhin abschätzen, daß der Carbenzerfall, wenn er überhaupt stattfindet, nur in ganz untergeordnetem Maße verlaufen kann.

Dieses Beispiel sollte zeigen, in wieweit sich die Protonenresonanz zur Analyse von Reaktionsmechanismen eignet. Zur qualitativen Analyse leistet die Methode auch ohne großen Aufwand ausgezeichnete Dienste, die quantitative Analyse dagegen ist noch mit einer gewissen Unsicherheit behaftet, hier sind andere Methoden vorzuziehen.

Dr. V. Franzen, Max-Planck-Institut f. Medizinische Forschung, Institut für Chemie, Heidelberg, Jahnstraße 29

Institut für Elektrowerkstoffe Freiburg i. Br.

Über einige Molekülstrukturuntersuchungen mittels Kernresonanzspektroskopie

Von
GERHARD ENGLERT

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 26. November 1960)

Die Kernresonanzspektroskopie stellt bei der Aufklärung der Struktur von Molekülen eine sehr wertvolle Ergänzung anderer physikalisch-chemischer Methoden, wie z. B. der Ultraviolett-, Infrarot- und Raman-Spektroskopie dar. Der größere apparative Aufwand und die Schwierigkeit der Meßtechnik werden dabei in sehr vielen Fällen durch den Vorzug aufgewogen, daß sich Kernresonanzspektren selbst bei komplizierten Verbindungen oft in einfacher Weise interpretieren lassen. Bei der Zuordnung der Spektren macht man Gebrauch davon, daß einmal die Lage der Signale (sog. chemische Verschiebung) z. B. von CH-, CH_2- und CH_3-Gruppen in charakteristischer Weise vom Bindungszustand abhängt, daß ferner die Aufspaltung des Signals eines Protons oder einer Gruppe von Protonen durch die Zahl der benachbarten Atomkerne mit magnetischen Momenten bestimmt ist, und die Signalintensität (Fläche) unter geeigneten apparativen Bedingungen direkt proportional zur Zahl der beteiligten Protonen ist, wodurch die Zuordnung wesentlich erleichtert wird.

Ohne hier näher auf die theoretischen Grundlagen[2,5,10] eingehen zu können, seien im folgenden einige Anwendungen speziell der Protonenresonanzspektroskopie bei der Aufklärung der Struktur von Molekülen diskutiert. Bezüglich der mit diesen Untersuchungen zusammenhängenden rein chemischen Fragen kann dabei auf andere Arbeiten verwiesen werden.

Über einige Molekülstrukturuntersuchungen

Bei der Aufklärung einer Molekülstruktur geht man im allgemeinen von gewissen Strukturformeln aus, die dem Chemiker auf Grund des vermuteten Ablaufes der Synthese plausibel erscheinen. Ein Beispiel bietet die Reaktion von Thiosemicarbazid (bzw. seiner methylsubstituierten Verbindungen) mit salpetriger Säure, wobei für das Endprodukt — wie an anderer Stelle dieser Tagung berichtet wurde[9] — vier verschiedene Strukturen denkbar wären (vgl. Abb. 1).

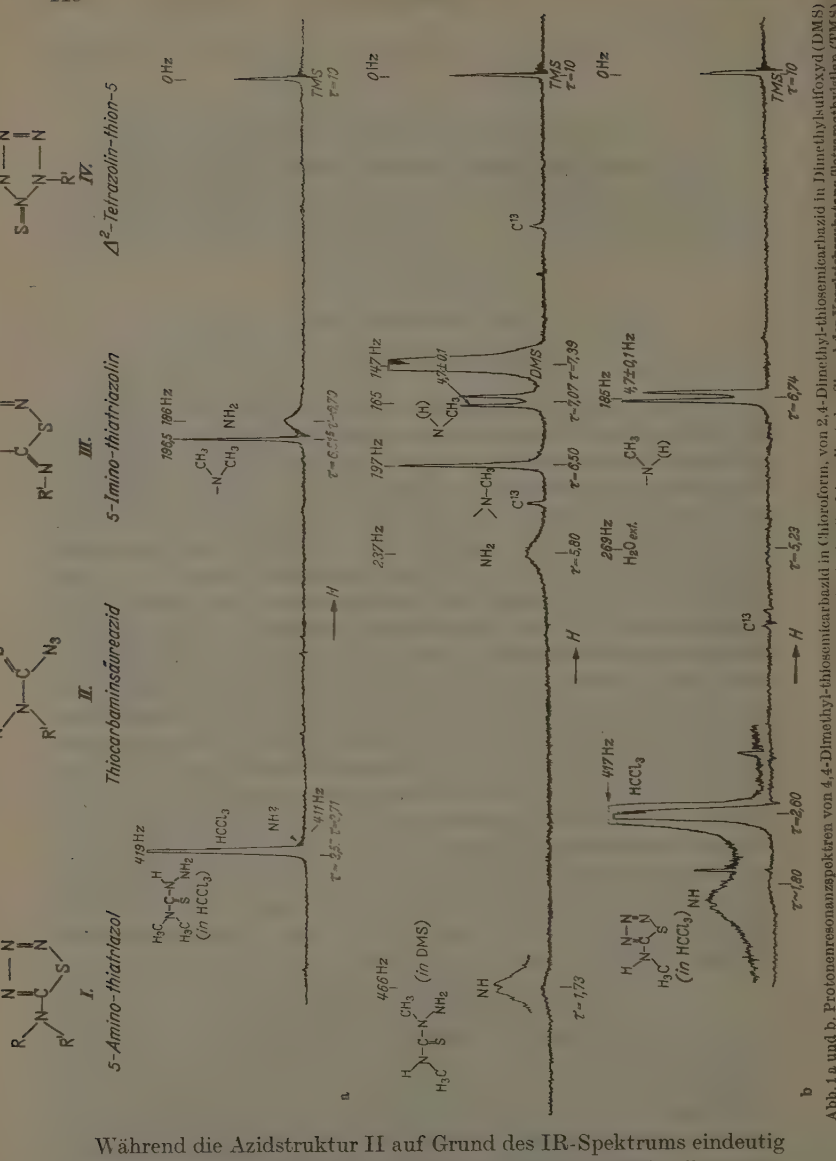


Abb. 1 a und b. Protonenresonanzspektren von 4,4-Dimethyl-thiosemicarbazid in Chloroform, von 2,4-Dimethyl-thiosemicarbazid in Dimethylsulfoxyd (DMS)

Während die Azidstruktur II auf Grund des IR-Spektrums eindeutig ausgeschlossen wurde[9], sind die Strukturen III und IV mit den Protonenresonanzspektren unvereinbar[4].

Abb. 1 zeigt die Protonenresonanzspektren von 4,4-Dimethyl-thiosemicarbazid in Chloroform, 2,4-Dimethyl-thiosemicarbazid in Dimethylsulfoxyd (DMS), sowie von dem Reaktionsprodukt von 4-Methyl-thiosemicarbazid mit salpetriger Säure, gelöst in Chloroform. Die erste Substanz zeigt neben dem an seiner großen Breite erkennbaren NH_2-Signal bei $\tau = 6{,}70$ ein einfaches Methylsignal bei $\tau = 6{,}51$, d. h. die Drehbarkeit um die C-N-Bindung ist so wenig behindert, daß die an sich verschieden abgeschirmten Protonen der beiden CH_3-Gruppen nur ein Signal ergeben. Im Spektrum der zweiten Substanz tritt dagegen neben dem CH_3-Signal bei $\tau = 6{,}50$, welches der Methylgruppe in 2-Stellung zugeordnet werden muß[4], ein Dublett bei $\tau = 7{,}07$ mit einem Linienabstand von $4{,}7 \pm 0{,}1$ Hz auf. Es ist das Signal der 4-Methylgruppe, dessen Aufspaltung durch Spin-Spin-Wechselwirkung mit dem Proton der $NHCH_3$-Gruppe verursacht ist. Es zeigt nämlich einmal das NH-Signal bei $\tau = 1{,}73$ eine eben noch erkennbare Quartettstruktur, zum anderen ist die Aufspaltung des CH_3-Signals unabhängig von der Feldstärke, wie Messungen bei 40 Mhz ergaben*.

Im Spektrum des Reaktionsproduktes ist zwar eine Quartettstruktur des NH-Signals bei $\tau = 1{,}80$ auch bei hoher Verstärkung nicht mehr erkennbar, doch tritt das CH_3-Signal bei $\tau = 6{,}74$ wieder als Dublett mit feldstärkeunabhängiger Aufspaltung von 4,7 Hz auf. Da bei Vorliegen der Strukturen III oder IV keine Spin-Spin-Wechselwirkung mehr zu erwarten wäre, muß somit auch hier eine $NHCH_3$-Gruppe, d. h. aber die Struktur I mit einem 1,2,3,4-Thiatriazol-Ringgerüst vorliegen.

Die beiden nächsten Beispiele befassen sich mit der Untersuchung der Struktur von cis-Isomeren bei Molekülen mit konjugierten C = C-Doppelbindungen.

Neben der all-trans-Dehydrogeraniumsäure (FP 187° C) ist ein cis-Isomeres (FP 137° C) bekannt[8], für welches eine 2-cis-4-trans-Struktur vermutet worden war. Neuerdings wurde nun eine dritte isomere Säure (FP 160° C) dargestellt[11], für welche daher zunächst eine 2-trans-4-cis- oder eine 2,4-di-cis-Struktur nahelag. Das Protonenresonanzspektrum des (aus Löslichkeitsgründen untersuchten) Methylesters beweist aber entgegen der Erwartung die 2-cis-4-trans-Struktur (vgl. Abb. 2).

So zeigen die Signale von H_γ und H_δ, die sich auf Grund ihrer Feinstruktur und der Intensität leicht zuordnen lassen, bei der all-trans- und bei der cis-Verbindung eine gleiche Aufspaltung von etwa $J_{\gamma\delta} = 15$ Hz, ein Wert, der in dem für trans-Spin-Spin-Kopplungen bekannten Bereich von 13—18 Hz[5,10] liegt. Damit ist zunächst eine 4-cis-Struktur ausgeschlossen, da in diesem Fall eine kleinere Aufspaltung ($J_{trans}/J_{cis} \sim 2$) zu erwarten wäre[5].

* Herrn Dr. W. Brügel, Ludwigshafen, möchte ich für die Durchführung der Messungen bei 40 Mhz herzlich danken.

Die 2-cis-Anordnung leitet sich aus der Beobachtung ab, daß sich beim Übergang von der trans- zur cis-Verbindung das β-Methylsignal nach höherem Feld ($\Delta\nu = 17$ Hz), das Signal von Hγ kräftig nach niederem Feld ($\Delta\nu = 91$ Hz) verschiebt. Nach analogen Beobachtungen von JACKMAN[5,6] wird ein derartiger Effekt durch eine geänderte räumliche Anordnung der diamagnetisch anisotropen Carbonylgruppe bezüglich H_γ und der CH_3-Gruppe hervorgerufen, d. h. durch Übergang in eine 2-cis-Struktur. Da entsprechende Verschiebungen auch in den Spektren der reinen Säuren beobachtet wurden, muß auch dort eine 2-cis-4-trans-Struktur vorliegen.

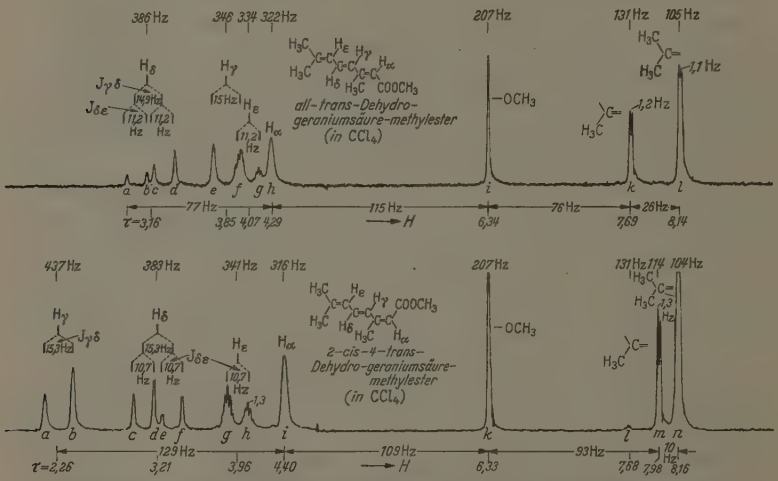


Abb. 2. Protonenresonanzspektren von all-trans- und von 2-cis-4-trans-Dehydrogeraniumsäure-methylester in CCl_4. Der Bereich der olefinischen Protonen wurde aus Zweckmäßigkeitsgründen mit höherer Verstärkung aufgenommen

Da die Wiederholung der Synthese der isomeren Säure vom Schmelzpunkt 137° C nicht mehr gelungen ist[11], bleibt die Frage nach der Struktur dieser Verbindung zunächst noch offen. Die Struktur der 160°-Säure bzw. ihres Methylesters scheint jedoch völlig gesichert, da nach Abschluß dieser Untersuchungen auch ein mit Hilfe der IR- und UV-Spektroskopie durchgeführter Strukturbeweis veröffentlicht wurde[14].

Das nächste Beispiel befaßt sich mit einer cis-isomeren 5-Phenyl-3-methyl-2,4-pentadien-Säure vom Schmelzpunkt 158° C, für welche früher[3] auf Grund chemischer und IR-spektroskopischer Beobachtungen eine 2-trans-4-cis-Struktur, später auf Grund von IR- und UV-Messungen umgekehrt eine 2-cis-4-trans-Struktur angenommen wurde[13].

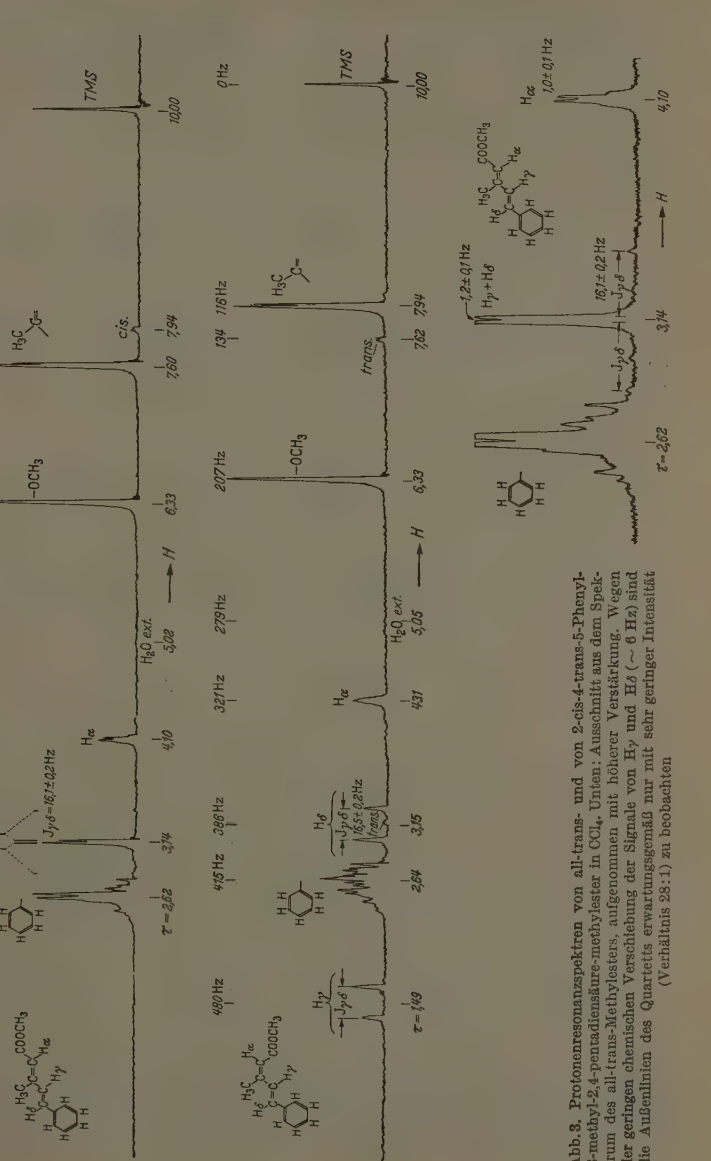


Abb. 3. Protonenresonanzspektren von all-trans- und von 2-cis-4-trans-5-Phenyl-3-methyl-2,4-pentadiensäure-methylester in CCl_4. Unten: Ausschnitt aus dem Spektrum des all-trans-Methylesters, aufgenommen mit höherer Verstärkung. Wegen der geringen chemischen Verschiebung der Signale von H_γ und H_δ (~ 6 Hz) sind die Außenlinien des Quartetts erwartungsgemäß nur mit sehr geringer Intensität (Verhältnis 28:1) zu beobachten

Abb. 3 zeigt die Protonenresonanzspektren der Methylester der 160°-Säure (alltrans) und der 158°-Säure (cis). Wie beim obigen Beispiel kann auch hier aus der Aufspaltung der Signale von H_γ und H_δ von etwa 16 Hz, sowie der Verschiebung des β-Methyl- und des H_γ-Signals eindeutig auf die 2-cis-4-trans-Struktur geschlossen werden.

Zum Abschluß wird noch über vorläufige Ergebnisse von Untersuchungen an Furoxanverbindungen berichtet, deren Struktur — wie einem zusammenfassenden Artikel von KAUFMAN u. PICARD[7] zu entnehmen ist — trotz über 60jähriger Forschung noch nicht eindeutig geklärt werden konnte. Es stehen vor allem die in Abb. 4 angegebenen Strukturen zur Diskussion.

Bei aliphatischen Furoxanen, bei denen die beiden C-Atome nicht Teil eines konjugierten Ringsystems sind, konnten durch Vertauschen von ungleichen Substituenten R und R' isomere Verbindungen mit anderen Eigenschaften, z. B. verschiedenen Schmelzpunkten, dargestellt werden[7]. Dieser chemische Befund spricht für die unsymmetrische Furoxanstruktur I.

In Übereinstimmung hiermit sind die Ergebnisse der Protonenresonanzuntersuchungen an Dimethylfuroxan ($R = R' = CH_3$). Das Spektrum weist nämlich zwei Methylsignale auf, wie dies auf Grund der geringen Molekülsymmetrie nach Struktur I zu erwarten ist. Umgekehrt besitzt das zum Vergleich abgebildete Spektrum des symmetrisch gebauten Dimethylfurazans nur ein einfaches Methylsignal, da die Protonen der beiden Methylgruppen wegen der Symmetrie der Elektronenhülle in gleicher Weise abgeschirmt sind.

Bei aromatischen Furoxanen liegen die Verhältnisse komplizierter. Nimmt man zunächst auch hier die unsymmetrische Struktur I an, so sollten sich z. B. die in 5- bzw. 6-Stellung substituierten Benzofuroxane in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften unterscheiden. Dieser rein chemische Nachweis ist aber bis heute nicht gelungen[7]. Auch wurde bisher vergeblich nach isomeren Verbindungen des Pyrido-2,3-furoxans oder des Naphtho-1,2-furoxans gesucht[1], deren Existenz bei Vorliegen von Struktur I zu erwarten wäre. Man hat daher neuerdings meist die symmetrischen Strukturen II oder III vorgezogen oder eine schnelle Umwandlung der Struktur I über die Struktur II diskutiert.

Das Protonenresonanzspektrum von Benzofuroxan (in CCl_4) ist in Abb. 5 zusammen mit demjenigen des Benzofurazans (in CS_2) in hoher Auflösung abgebildet. Im letzten Fall drückt sich die hohe Molekülsymmetrie in der Symmetrie des Spektrums aus: das sogenannte A_2B_2-Spektrum[10] (zwei Paare gleichwertiger Protonen) besteht aus zwei innerhalb der Meßgenauigkeit identischen Hälften. Die äußere Erscheinungsform eines derartigen A_2B_2-Spektrums hängt zwar stark von den Werten der Kopplungskonstanten und der chemischen Verschiebung zwischen

den zwei Paaren von Protonen ab, doch sollte die Symmetrie auf Grund der Theorie[10] erhalten bleiben.

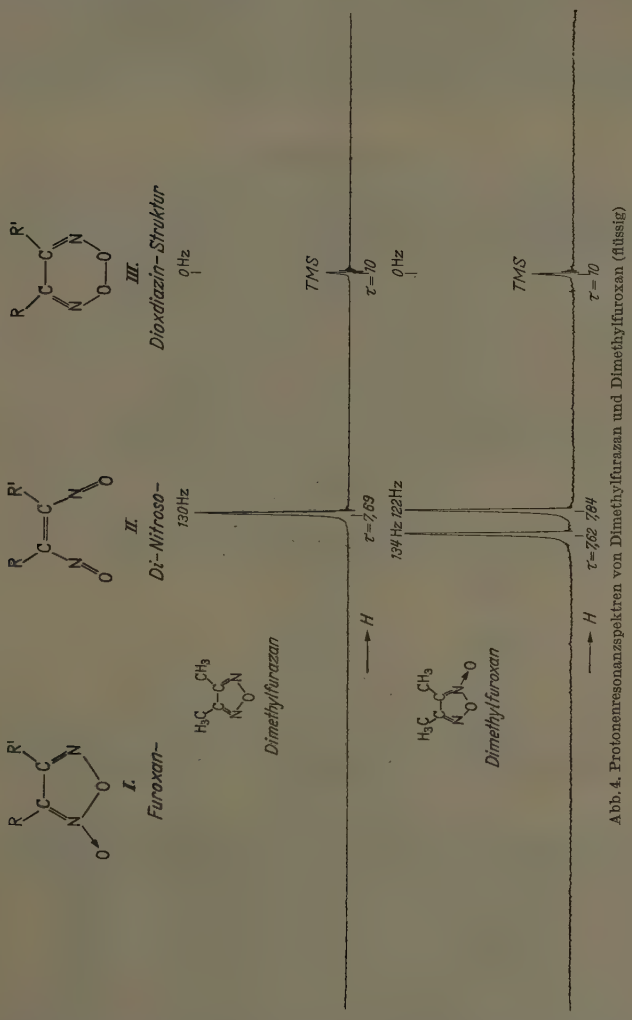


Abb. 4. Protonenresonanzspektren von Dimethylfurazan und Dimethylfuroxan (flüssig)

Das stark verwaschene Spektrum des Benzofuroxans, dessen Schwerpunkt mit der stärksten Linie bei $\tau = 2{,}66$ zusammenfällt, weist weder bezüglich der Intensitäten noch der Frequenzabstände vom Zentrum

eine derartige Symmetrie auf, so daß der Schluß auf das Vorliegen der unsymmetrischen Struktur I naheliegt.

Da wir die Diskrepanz mit den rein chemischen Befunden zur Zeit noch nicht deuten können, beabsichtigen wir, unsere Untersuchungen auf einige andere aromatische Furoxane auszudehnen. Hierzu sollen auch noch die Messungen der N^{14}-Signale dieser Verbindungen mit einbezogen werden.

Experimentelles

Die abgebildeten Spektren wurden mit einem Varian-Kernresonanzspektrometer V 4302 (56,4 Mhz) mit Magnetfeldstabilisator bei Zimmertemperatur aufgenommen. Die Linienabstände (obere Skala in den Spektren) vom Signal des Tetra-

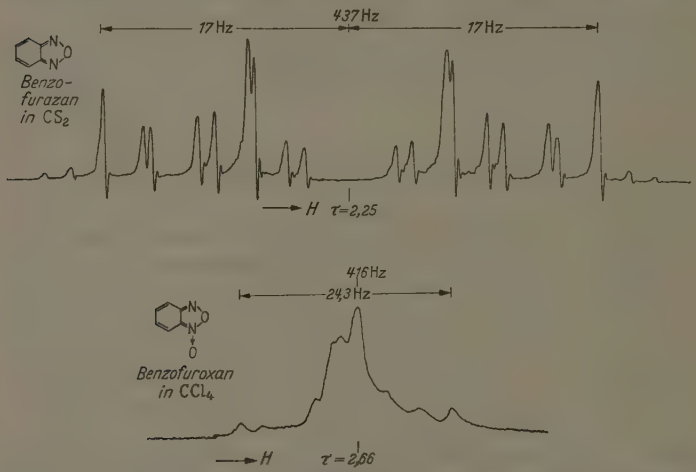


Abb. 5. Protonenresonanzspektren von Benzofurazan in CS_2 und Benzofuroxan in CCl_4 bei hoher Auflösung

methylsilans (TMS, innerer Standard) wurden durch Seitenbandtechnik mit einem Hewlett-Packard-Niederfrequenzoscillator 200 CD bestimmt. Ferner wurden die Linienlagen in der feldstärkeunabhängigen τ-Skala[12] (in ppm) angegeben. Die Substanzen wurden entweder als reine Flüssigkeiten oder als Lösungen mit einer Konzentration zwischen 20 und 50% in Glasröhrchen mit einem Innendurchmesser von etwa 3 mm untersucht.

Zum Schluß danke ich den Herren Dr. M. KUHN und Dr. G. SCHEUERBRANDT sowie Herrn Prof. Dr. W. LÜTTKE für die Überlassung der hier untersuchten Substanzen. Ferner gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. R. MECKE für seine fördernde Unterstützung.

Anmerkung bei der Korrektur. Wie die Untersuchung des Spektrums von Benzofuroxan zwischen −60° und +100°C inzwischen ergab, ist tatsächlich ein inner-

molekularer Umklappvorgang anzunehmen. Das bei Zimmertemperatur stark verwaschene Spektrum geht nämlich bei niederer Temperatur (−60°C) in ein aus scharfen Einzellinien bestehendes, noch stärker unsymmetrisches Spektrum über, d.h. das Molekül kann tatsächlich keine C_2-Symmetrie besitzen. Bei höherer Temperatur entsteht ebenfalls ein aus scharfen Einzellinien bestehendes Spektrum, das aber bereits bei +60°C eindeutig als A_2B_2-Spektrum angesehen werden muß. Über die Ergebnisse dieser Untersuchungen soll an späterer Stelle noch ausführlich berichtet werden.

Literatur

[1] BOYER, J. H., D. I. MCCANE, W. J. CARVILLE u. A. I. TWEEDIE: J. Amer. chem. Soc. **75**, 5298 (1953). — [2] BROWNSTEIN, S.: Chem. Reviews **59**, 463 (1959). — [3] CAWLEY, I. D., and D. R. NELAN: J. Amer. chem. Soc. **77**, 4125, 4130 (1955). — [4] ENGLERT, G., u. M. KUHN: noch unveröffentlichte Protonenresonanzuntersuchungen an Thiosemicarbaziden und 5-Amino-thiatriazolen. — [5] JACKMAN, L. M.: Applications of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, Pergamon Press, London 1959. — [6] JACKMAN, L. M., and R. H. WILEY: Proc. chem. Soc. (London) **77**, 196 (1958). — [7] KAUFMAN, J. V. R., u. G. P. PICARD: Chem. Reviews **59**, 429 (1959). — [8] KUHN, R., u. M. HOFFER: Ber. dtch. chem. Ges. **65**, 651 (1932). — [9] KUHN, M., u. R. MECKE: Vortrag bei dieser Tagung; vgl. diese Z. **181**, 487 (1961). — [10] POPLE, J. A., W. G. SCHNEIDER u. H. J. BERNSTEIN: High Resolution Nuclear Magnetic Resonance, New York 1959. — [11] SCHEUERBRANDT, G.: Diss. Freiburg 1960. — [12] TIERS, G. V. D.: J. physic. Chem. **62**, 1151 (1958). — [13] WILEY, R. H.: J. chem. Soc. (London) **1958**, 3831. — [14] WILEY, R. H., E. IMOTO, R. P. HOUGHTON u. P. VEERAVAGU: J. Amer. chem. Soc. **82**, 1413 (1960).

Dr. G. ENGLERT, Institut für Elektrowerkstoffe, Freiburg i. Br., Eckerstr. 4

Shell-Grundlagenforschung-Gesellschaft m.b.H. Schloß Birlinghoven

Beispiele zur Strukturbestimmung organischer Verbindungen durch Kerninduktionsspektroskopie

Von

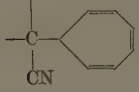
H. WEITKAMP, K. H. BÜCHEL, F. WIESE und F. KORTE

(Eingegangen am 4. November 1960)

Durch Kerninduktionsspektroskopie wird gezeigt, daß bei der Reaktion von Tropyliumbromid mit Na-R-Verbindungen in 7-Stellung monosubstituierte Cycloheptatrienderivate erhalten werden. Folgende

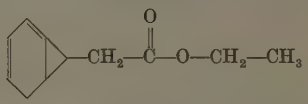
Verbindungen, deren Spektren diskutiert werden, wurden untersucht:

R = —H
—$CH_2COO—CH_2—CH_3$
—$CH_2—COOH$
—CN
CN
—C—H
COO—$CH_2—CH_3$
COO—$CH_2—CH_3$



Setzt man hingegen Dibromcycloheptadien mit Natriummalonester um, verseift und decarboxyliert, so erhält man eine Monocarbonsäure. Durch Gaschromatographie ihres Äthylesters werden 3 Verbindungen isoliert. Kerninduktionsspektroskopische Untersuchungen zeigen, daß es sich dabei um die in 7- beziehungsweise 1-Stellung monosubstituierten Cycloheptatrienderivate handelt. Die dritte Komponente ist kein Cycloheptatrienderivat. Sie ist ein Äthylester und enthält zwei C = C-Doppelbindungen, die durch 3 Wasserstoffatome substituiert sind.

Das Kernresonanzspektrum, die Mikrohydrierung, das UV-Spektrum sowie die CH-Analyse sind in Übereinstimmung mit folgender Struktur:



Dr. H. WEITKAMP, Schloß Birlinghoven über Siegburg, (22c) Siegburg 1, Postfach 88

Chemisches Institut der Universität Tübingen

Zur Aufklärung mesomerer Strukturen organischer Radikale durch Elektronenresonanz

Von
KLAUS SCHEFFLER

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 14. November 1960)

Der Paramagnetismus eines organischen Radikals ist auf das nichtabgesättigte magnetische Moment μ_B des Einzelelektrons zurückzuführen. Der Elektronenspin $S = {}^1/_2$ dieses Elektrons kann sich zu einem

äußeren Magnetfeld H_0 parallel oder antiparallel einstellen. Diese beiden Niveaus, charakterisiert durch die magnetischen Quantenzahlen $m_s = +1/2$ und $m_s = -1/2$, sind durch den Energieabstand $\Delta E = g \cdot \mu_B \cdot H_0$ voneinander getrennt, wobei der g-Faktor für freie Radikale etwa 2 beträgt. Strahlt man diese Energie in Form von Mikrowellen der Frequenz $\nu = \Delta E/h$ ein, so können magnetische Dipolübergänge induziert werden; die daraus resultierende Absorption der Probe kann durch einen geeigneten Detektor nachgewiesen werden.

Werden die Radikale in Lösung gemessen, so spaltet die Absorptionslinie oft in mehrere Komponenten auf. Diese Aufspaltung ist auf die Wechselwirkung des freien Elektrons mit den magnetischen Kernen des Moleküls, i. a. Protonen und N-Kerne, zurückzuführen. Die Größe der Aufspaltung a [Gauß] ist proportional der Aufenthaltswahrscheinlichkeit $|\Psi(K)|^2$ des ungesättigten Elektrons an dem diskutierten Kern K. Bei guter Auflösung des Spektrums kann man aus der Anzahl der Komponenten und ihren Intensitätsverhältnissen schließen, an welchen Kernen eine Aufenthaltswahrscheinlichkeit des „odd" Elektrons besteht und wie groß diese ist.

Die an einen aromatischen Kern gebundenen Wasserstoffatome liegen mit ihren Kernen in der Ebene des Moleküls. Diese fällt mit der Knotenebene des π-Elektronensystems des Aromaten zusammen, man sollte demnach wegen $|\Psi(K)|^2 = 0$ keine Aufspaltung der Protonen erwarten. Eine π-σ-Wechselwirkung sorgt jedoch dafür, daß über die C-H-σ-Bindung eine Spinpolarisation am Proton und dadurch eine Aufspaltung auftritt[2].

Diese Aufspaltung ist proportional zur freien Elektronendichte ϱ am bindenden Kohlenstoff: $a = Q \cdot \varrho$, wobei $|Q| = 23$ Gauß beträgt[1]. Mit Hilfe dieser Beziehung können die Elektronendichten aus den experimentell bestimmten a-Faktoren angegeben werden.

Die Radikale wurden durch Dehydrierung der entsprechenden Phenole mit Kaliumhexacyanoferrat(III) in alkalischem Medium gewonnen. Die Messungen wurden in sauerstofffreier benzolischer Lösung vorgenommen. Die angeführten EPR-Spektren zeigen die erste Ableitung der Absorptionslinien.

Die Abb. 1 gibt das EPR-Spektrum des 2,4,6-Tri-tert.butylphenoxyls wieder. Die drei Komponenten im Intensitätsverhältnis von 1:2:1 lassen sich durch die Wechselwirkung des freien Elektrons mit den Protonen in der Metastellung des Benzolkerns erklären. Eine sichere experimentelle Stütze erhält diese Annahme durch das Spektrum der in einer Metastellung deuterierten Substanz. Da das Deuterium praktisch keine Aufspaltung liefert, erkennt man (Abb. 2) nur noch die Aufspaltung durch das verbliebene Metaproton. Auf Grund der experimentell gefundenen Wechselwirkung muß man an dem Kohlenstoff in der Metastellung

eine freie Elektronendichte von 7,8% annehmen. Diese Tatsache führt dazu, daß man für dieses Radikal — und auch für die weiter unten diskutierten — außer den klassisch zu formulierenden Strukturen auch solche heranzuziehen hat, bei denen das Radikalelektron in der Metastellung sitzt. In Abb. 3 ist die erste Hälfte des Spektrums bei einer Verdünnung von etwa 10^{-4} mol dargestellt. Man erkennt, daß jede Einzelkomponente des Tripletts nochmals aufspaltet. Da für eine weitere Wechselwirkung des Elektrons nur noch die Protonen der tert. Butylgruppen in Frage kommen, so ist gesichert, daß zumindest die paraständige tert. Butylgruppe an der Mesomerie des Moleküls beteiligt ist.

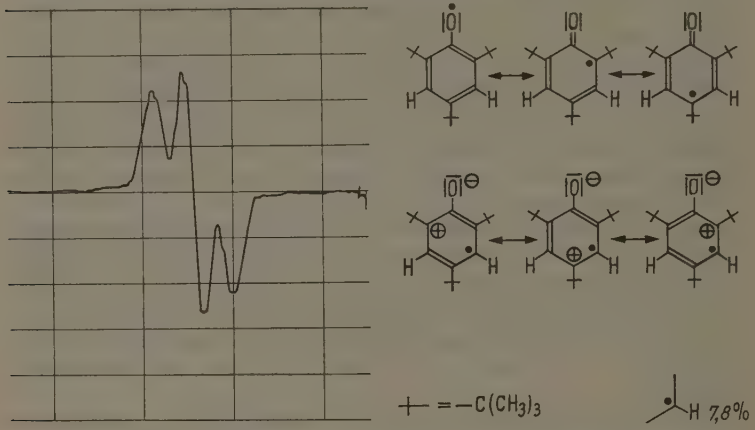


Abb. 1. EPR-Spektrum und mesomere Strukturen des 2,4,6-Tri-tert.butyl-phenoxyls

Die Aufspaltung des EPR-Spektrums des 2,6-Di-tert.butyl-4-diphenylmethyl-phenoxyls (Abb. 4) in zwei Gruppen, ist der Aufenthaltswahrscheinlichkeit des „odd" Elektrons an dem Methylproton zuzuschreiben. Hier muß man hyperkonjugierte Formulierungen, wie sie auf der Abbildung gezeigt sind, hinzuziehen. Aus der Größe der Aufspaltung von 8,3 Gauß kann man auf eine freie Elektronendichte von 33% in Parastellung des Moleküls schließen*. Die weitere Aufspaltung in je drei Komponenten läßt sich wiederum durch eine Metadichte des Elektrons von 7,8% erklären.

Durch das Auftreten von neuen Linien im Spektrum des 2,6-Di-tert.-butyl-4-cano-phenoxyls (Abb. 5) ist eine Spindichte am Stickstoff und ebenfalls in der Metastellung erwiesen. Letztere ist gegenüber den vorher behandelten Substanzen auf 9,5% angestiegen. Offenbar hat sich dadurch die Dichte des freien Elektrons im Parasubstituenten verkleinert.

* Dabei ist eine freie Drehbarkeit des p-Substituenten vorausgesetzt.

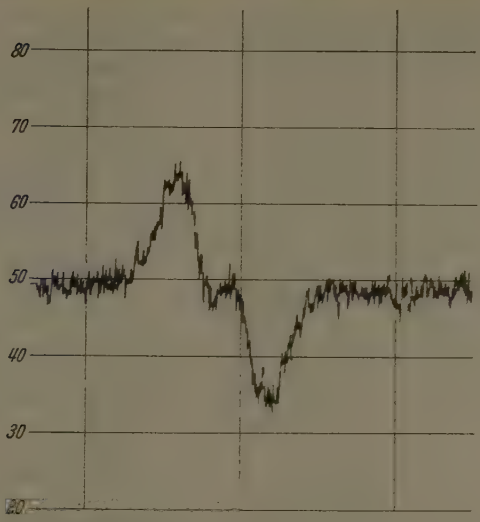


Abb. 2. EPR-Spektrum des 2,4,6-Tri-tert.butyl-5-deutero-phenoxyls

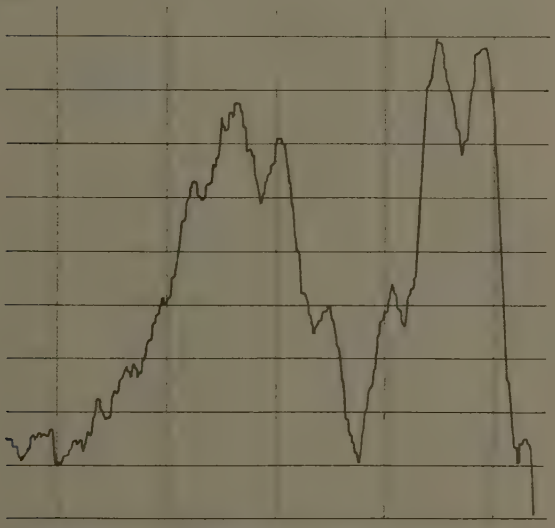


Abb. 3. Teil des EPR-Spektrums des 2,4,6-Tri-tert.butyl-phenoxyls

Trotzdem muß man wegen der gefundenen Aufspaltung durch den Stickstoffkern der diesen Befund charakterisierenden Formulierung ein gewisses Gewicht geben. Da die π-σ-Wechselwirkung am Stickstoffatom bisher nicht theoretisch untersucht wurde, kann man über seine freie Elektronendichte keine Aussage machen.

Das etwas kompliziertere Spektrum des 2,6-Di-tert.-butyl-4-methoxyphenoxyls (Abb. 6) kann man durch Einbeziehung der Protonen der Methoxylgruppe deuten. Durch die auf diese Weise experimentell erwiesene Beteiligung dieser Protonen an der Mesomerie gelangt man zu Strukturen, bei denen sich das Einzelelektron am Wasserstoffkern befindet. Das Gewicht

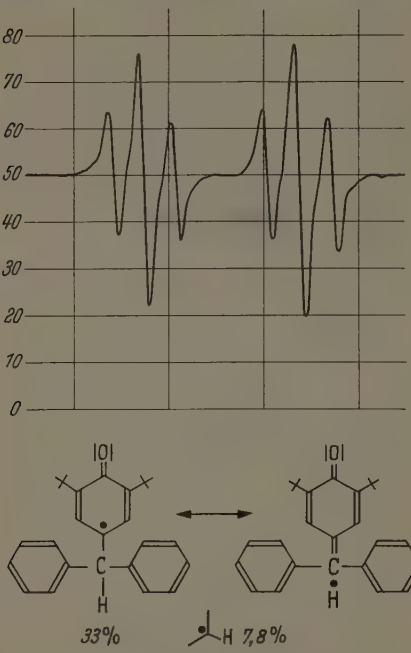


Abb. 4. EPR-Spektrum und hyperkonjugierte Formulierung des 2,6-Di-tert.butyl-4-diphenylmethylphenoxyls

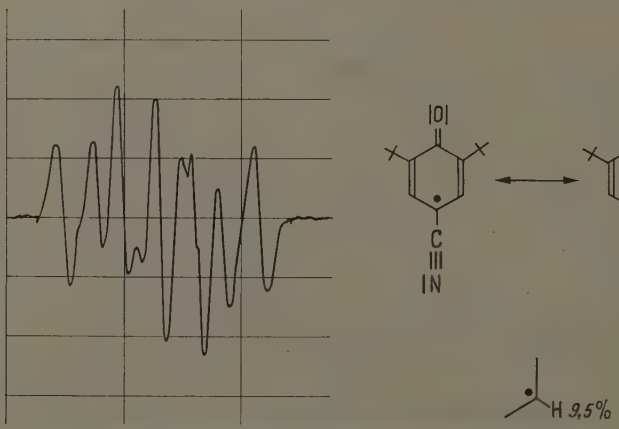


Abb. 5. EPR-Spektrum des 2,6-Di-tert.butyl-4-cyano-phenoxyls

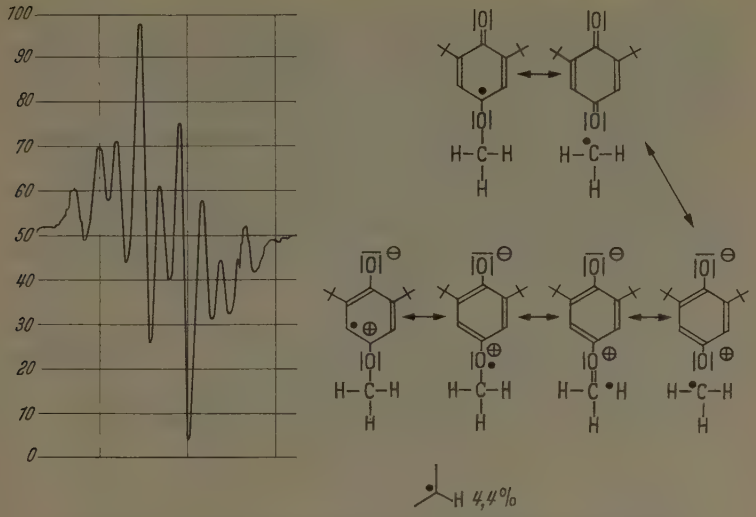


Abb. 6. Spektrum und zugehörige Strukturen des 2,6-Di-tert.butyl-4-methoxy-phenoxyls

einer solchen Struktur beträgt allerdings nur etwa $3‰$. Die große π-Elektronendichte am Sauerstoff ermöglicht es dem Radikalelektron, mesomer in den Parasubstituenten hineinzuwandern. Dementsprechend nimmt die Dichte in Metastellung auf $4{,}4\%$ ab.

Die Abb. 7 zeigt das EPR-Spektrum des 2,6-Di-tert.-butyl-4-phenylphenoxyls; hier konnten die Einzelkomponenten nicht zugeordnet werden. Der Befund, daß das Spektrum mehr Linien aufweist, als man bei einer Wechselwirkung lediglich mit den Metaprotonen erwarten würde, besagt jedoch schon, daß der parasständige Phenylkern stark an der Mesomerie beteiligt ist. Die entsprechenden aufgeführten

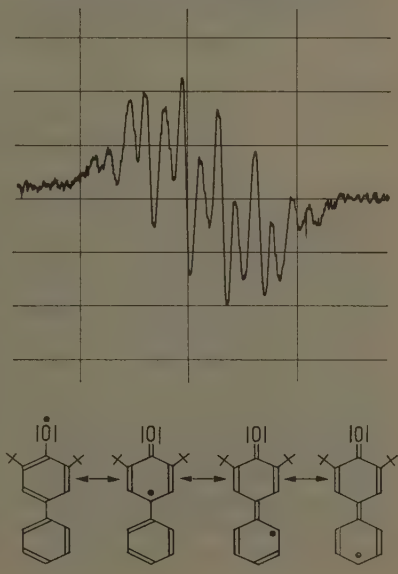


Abb. 7. EPR-Spektrum und mesomere Formulierungen des 2,6-Di-tert.butyl-4-phenyl-phenoxyls

Formulierungen sind also unbedingt zu berücksichtigen, wenn man sich ein Bild über die mesomeren Formen dieses Radikals machen will. Da damit die Konjugation in den Phenylkern erwiesen ist, muß seine Ebene im wesentlichen mit der des Grundgerüstes zusammenfallen.

Einzelheiten, weiteres Versuchsmaterial und eine eingehende theoretische Diskussion erscheinen demnächst a. a. O.

Dem Direktor des chemischen Instituts, Herrn Prof. Eugen Müller, danke ich herzlich für die stete Förderung der Untersuchungen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sei für die Überlassung der Apparaturen ergebenst gedankt.

Literatur

[1] Jarrett, H. S.: J. chem. Physics **25**, 1289 (1956). — [2] McConnell, H. M.: J. chem. Physics **24**, 764 (1956). — Bersohn, R.: J. chem. Physics **24**, 1066 (1956). — Weissman, S. I.: J. chem. Physics **25**, 890 (1956).

Prof. Dr. Eugen Müller, Chemisches Institut der Universität Tübingen, Wilhelmstraße 33

Institutionen för medicinsk biokemi, Göteborg, Schweden

Massenspektrometrie als Hilfsmittel bei der Strukturbestimmung organischer Verbindungen, besonders bei Lipiden und Peptiden

Von

E. Stenhagen

Mit 20 Textabbildungen

(Eingegangen am 18. Oktober 1960)

Die Verwendung des Massenspektrometers zur chemischen Analyse wurde schon 1913 von Thomson[24] vorgeschlagen. Erst etwa 40 Jahre später ist aber die Methode in größerem Umfang in die organisch-chemische Analyse eingeführt worden. Dies geschah in Laboratorien der chemischen Industrie, besonders durch McLafferty[15,16] (Dow Chemical Company) in den Vereinigten Staaten und durch Beynon[2,3] (Imperial Chemical Industries) in England. Weiterhin wurde die massenspektrometrische Analyse mit gutem Erfolg zur Lösung von Strukturproblemen auf dem Lipidgebiet herangezogen[22,23]. Es wird wahrscheinlich nicht lange dauern, bis der massenspektrometrischen Analyse bei Strukturbestimmungen in der organischen Chemie dieselbe Stellung zukommt wie jetzt z.B. der Infrarotspektrometrie und der magnetischen Kernresonanz.

Bei der massenspektrometrischen Analyse[11] wird die zu untersuchende Verbindung bei sehr niedrigem Druck (etwa 10^{-5} Torr) mit langsamen Elektronen (10—100 eV) beschossen. Die Reaktionen, die dabei stattfinden, sind von sehr komplizierter Natur[25]. Bei einem möglichen Primärprozeß wird ein Elektron aus der organischen Verbindung (M) losgerissen. Dabei entsteht ein Molekülion. Dieses ist im allgemeinen nicht stabil und zerfällt nach kurzer Zeit in Bruchstücke, die sowohl negative als auch positive Ladung haben können oder auch elektrisch neutral sind. Die Natur der Bruchstücke und ihre relative Häufigkeit hängt in erster Linie von der Struktur der organischen Verbindung ab. Gewöhnlich

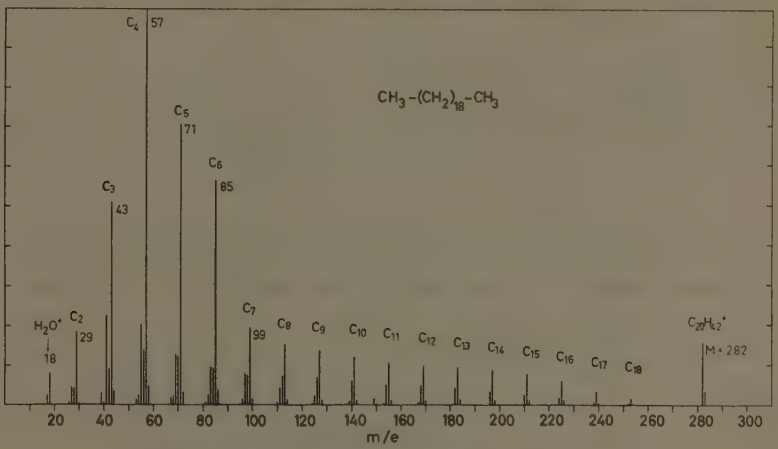


Abb. 1. Massenspektrum des n-Eicosans. (Nach RYHAGE u. STENHAGEN[18])

wird das Verhältnis von Masse zu Ladung (m/e)nur für positiv geladene Ionen im Massenspektrometer gemessen. Die hier wiedergegebenen Massenspektren wurden von Dr. R. RYHAGE in Stockholm mit einem von ihm gebauten Dempster-Instrument für hohe Massen aufgenommen[17].

Abb. 1 zeigt das Massenspektrum eines normalen Kohlenwasserstoffs. Das Spektrum enthält praktisch nur einfach geladene Ionen, die in Gruppen auftreten. Innerhalb jeder Gruppe besitzen die Ionen dieselbe Anzahl von Kohlenstoffatomen, und der Unterschied liegt in der Anzahl der Wasserstoffatome. Das Molekülion ist deutlich zu sehen, aber die Mehrzahl der Ionen besteht aus kleineren Bruchstücken. Das Butylion $C_4H_9^+$ ist das am häufigsten vorkommende Ion. Die einfachste Erklärung der Bildung dieser Serie von Ionen wäre die, daß die Ionen durch einfaches Zerspalten der Bindung zwischen zwei Kohlenstoffatomen der Kette gebildet werden. Die Untersuchung eines langkettigen Kohlenwasser-

stoffs, in dem die beiden endständigen Methylgruppen durch Trideuteromethyl ersetzt sind, gibt jedoch ein anderes Bild. Das Spektrum von

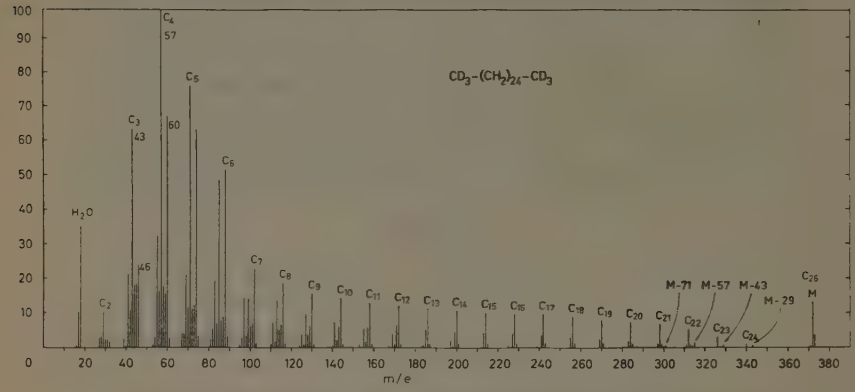


Abb. 2. Massenspektrum des 1,1,1,26,26,26-Hexadeuterohexacosans. (Nach DINH u. Mitarb.[10])

1,1,1,26,26,26-Hexadeuterohexacosan (Abb. 2)[10] zeigt, daß nur etwa die Hälfte der Butylionen eine Trideuteromethylgruppe enthalten und durch einfaches Spalten der Ketten entstanden sein können. Die übrigen müssen

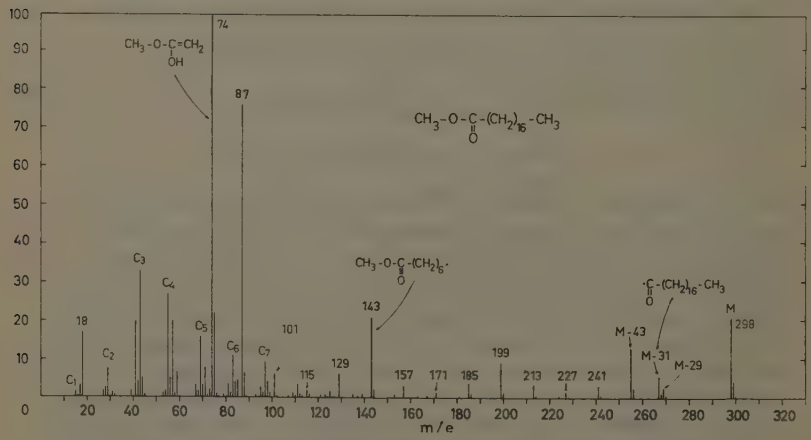


Abb. 3. Massenspektrum des Methylstearats. (Nach RYHAGE u. STENHAGEN[10,22])

durch Herausreißen von 4 Methylengruppen aus der Kette mit gleichzeitiger Umlagerung eines Wasserstoffatoms gebildet worden sein. Von großem Interesse ist auch, daß sich im Gebiet der hohen Massen eine

Reihe von Ionen mit m/e = M-29, M-43, ... M-85 befindet. Diese Ionen enthalten also beide Trideuteromethylgruppen und müssen durch Eliminierung von zwei bis sechs Methylengruppen + einem Wasserstoffatom aus der Kette mit gleichzeitiger Zusammenkopplung der beiden Kettenenden gebildet worden sein.

Wenn am Ende einer Kohlenstoffkette eine Carboxyl- oder Methoxycarbonylgruppe vorhanden ist, nimmt die Fragmentierung im Massenspektrometer einen anderen Verlauf, indem Ionen mit intakter polarer

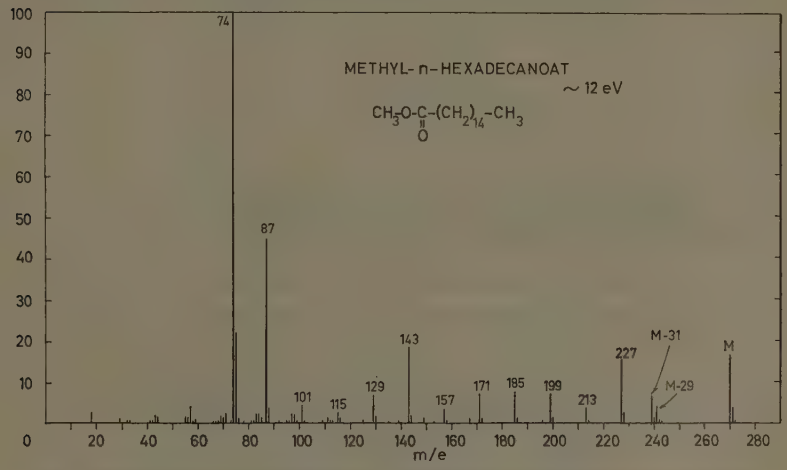


Abb. 4. Massenspektrum des Methylpalmitats, mit Elektronen niedriger Energie (etwa 12 eV) erhalten. (Nach DINH u. Mitarb.[10])

Gruppe viel häufiger auftreten als Ionen, die nur Kohlenstoff und Wasserstoff enthalten. Das Spektrum von Methylstearat[18] zeigt dies deutlich (Abb. 3). Wenn man das Massenspektrum mit niedriger Elektronenenergie aufnimmt (~ 10 eV), sinkt die Anzahl der Kohlenwasserstoff-Fragmente stark, und das Spektrum besteht aus sauerstoffhaltigen Ionen (vgl. Abb. 4). Die massenspektrometrische Untersuchung des Methylesters der ω-Trideutero-stearinsäure[10] (Abb. 5) zeigt, daß auch die Ionen der allgemeinen Formel $H_3C-O-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-(CH_2)_n-$ durch zwei verschiedene Mechanismen entstehen, nämlich durch einfache Kettenspaltung bzw. durch Eliminierung von $[-(CH_2)_m- + H]$. Während Ionen mit m/e 87, 101, 115 und 129 anscheinend hauptsächlich durch einfache Spaltung entstehen, werden Ionen mit höherem m/e oft überwiegend durch den zweiten Mechanismus gebildet. Die Ionen mit m/e = M-43 entstehen

praktisch nur durch Eliminierung, und zwar durch Eliminierung von $[-\overset{2}{CH_2}-\overset{3}{CH_2}-\overset{4}{CH_2}- + H]$. Wenn Deuteriumatome oder Alkylgruppen

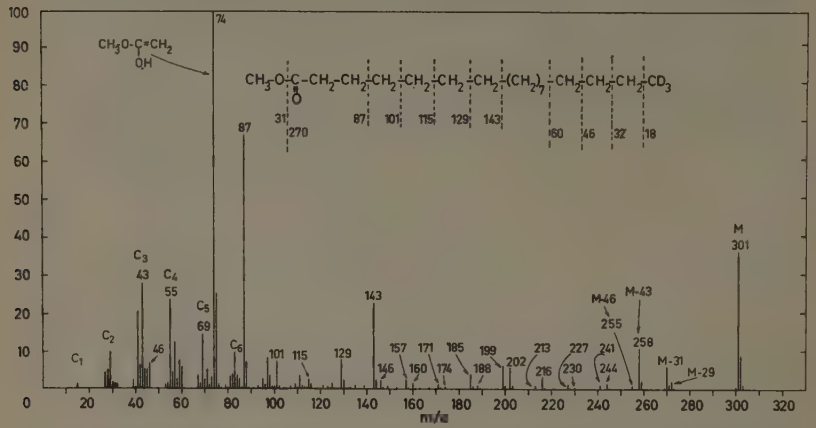


Abb. 5. Massenspektrum des Methylesters der 18,18,18-Trideuterostearinsäure. (Nach DINH u. Mitarb.[16])

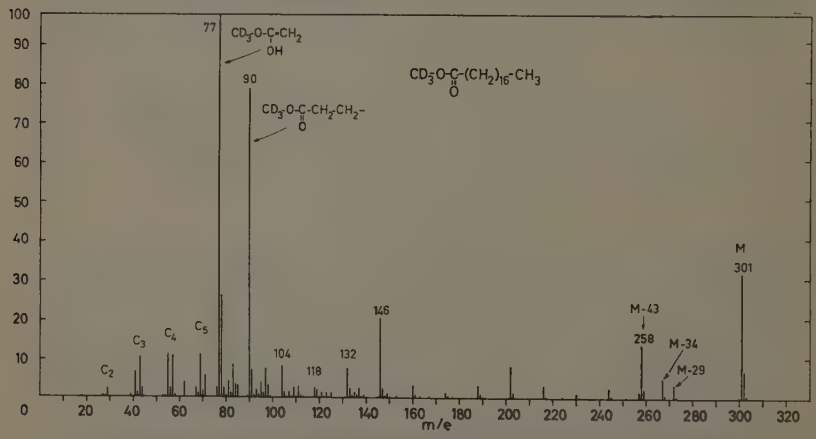


Abb. 6. Massenspektrum des Trideuteromethylesters der Stearinsäure. (Nach DINH u. Mitarb., nicht publiziert)

an eines oder mehrere der Kohlenstoffatome 2, 3 oder 4 gebunden sind, werden sie auch eliminiert. So gibt z.B. der 4-Methyl-pentacosansäure-methylester m/e = M-57 an Stelle von m/e = M-43 wegen Eliminierung von

$$[-CH_2-CH_2-\underset{\displaystyle CH_3}{\underset{|}{CH}}- + H]^{19}.$$

Wenn Methyl (m = 15) in der Estergruppe durch Trideuteromethyl (m = 18) ersetzt wird, verschieben sich die m/e der Methoxycarbonylionen um drei Einheiten nach höheren Massenzahlen. Im Massenspektrum des Trideuteromethylstearats (Abb. 6) ist von den sauerstoffenthaltenden Ionen nur noch das Acylion (m/e = 267) nicht verschoben.

Die Ionen, die aus einem langkettigen normalen Methylester in der größten Menge gebildet werden, haben ein Verhältnis zwischen Masse und Ladung (m/e) von 74. Da die Ionen eine gerade Massenzahl besitzen, müssen sie durch Spaltung der Kette und gleichzeitige Umlagerung eines

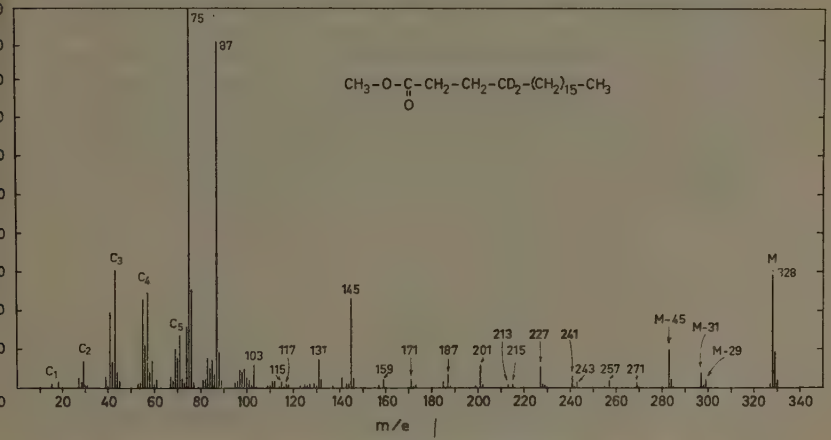


Abb. 7. Massenspektrum des Methylesters der 4,4-Dideuteroeicosansäure. (Nach DINH u. Mitarb.[10])

Wasserstoffatoms entstehen. Es ist angenommen worden, daß der Wasserstoff vom Kohlenstoffatom 4 genommen wird und daß ein neutraler, ungesättigter Kohlenwasserstoff entsteht[13,14].

$$[H_3C{-}O{-}\overset{1}{\underset{\|}{C}}{-}O{-}\overset{2}{C}H_2{-}\overset{3}{C}H_2{-}\overset{4}{C}H_2{-}R]^+ \rightarrow [H_3C{-}O{-}\overset{1}{C}{=}\overset{2}{C}H_2]^+ + \overset{3}{C}H_2{=}\overset{4}{C}H{-}R$$

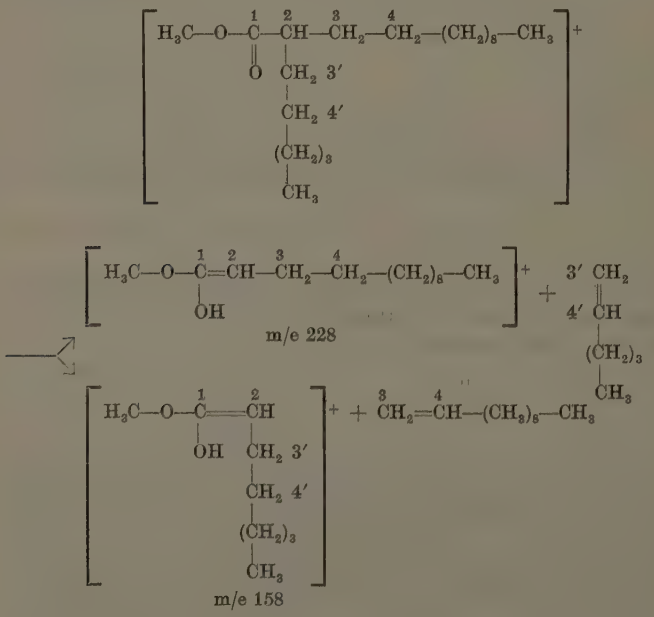
m/e 74

Daß die Reaktion tatsächlich so verläuft, zeigen die Massenspektrogramme einer Reihe von gem. dideuterosubstituierter Methylester mit den Deuteriumatomen in Stellung 2—6[10]. Nur bei 4,4-Dideuterosubstitution (Abb. 7) erhält man m/e 75 an Stelle von m/e 74 $[H_3C{-}O{-}\overset{|}{\underset{OD}{C}}{=}CH_2]^+$.

Man sieht auch, daß Ionen mit m/e = M-45 in größerer Anzahl auftreten. An Stelle von $[-\overset{2}{C}H_2{-}\overset{3}{C}H_2{-}\overset{4}{C}H_2- + H]$ wird jetzt $[-CH_2{-}CH_2{-}CD_2-$

+ H] eliminiert. Methylverzweigungen in α-Stellung werden in dem umgelagerten Ion behalten. Ein α-methyl-substituierter Ester gibt m/e 88 an Stelle von m/e 74[19].

Zwei direkte massenspektrometrische Strukturbestimmungen von Fettsäuren mit verzweigter Kohlenstoffkette sollen hier erwähnt werden. Aus einem Estergemisch, das von Whiting u. Mitarb.[9] in Oxford durch drastischen Abbau aus dem Antibioticum Lagosin (A 246) erhalten worden war, wurde von Ställberg-Stenhagen durch gaschromatographische Trennung (Abb. 8) ein Methylester erhalten, der das in Abb. 9 wiedergegebene Massenspektrogramm lieferte. Das Molekülgewicht war 312, es lag also der Methylester einer gesättigten Fettsäure mit 19 Kohlenstoffatomen vor. Das Vorkommen von größeren Mengen von zwei Ionen mit geradem m/e war schwer zu verstehen, bis wir auf den Gedanken kamen, daß aus einem Ester mit einer α-Seitenkette, die länger als eine Methylgruppe ist, zwei umgelagerte Ionen entstehen könnten. In diesem Falle war die Annahme einer α-Hexylseitenkette im Einklang mit dem Experiment:



Dieses analytische Ergebnis wurde durch die Synthese von dl-2n-Hexyl-tridecansäure-methylester bestätigt[9] (vgl. Abb. 9 b).

Vor einigen Jahren beschrieben SHORLAND u. Mitarb.[12] eine „C_{20}-mehrfachverzweigte", optisch aktive Fettsäure aus Butter. Ihre Konstitution wurde aber nicht bestimmt. Hierzu haben STÄLLBERG-STENHAGEN u. Mitarb.[7] die Säure erneut aus Butter mit Hilfe der gaschromatographischen Methodik isoliert. Das Massenspektrogramm des Methylesters ist aus Abb. 10 ersichtlich. Das Molekülgewicht des Methylesters (m/e des Molekülions) ist 326, was mit der empirischen Formel $C_{21}H_{42}O_2$ übereinstimmt. Eine monomethylierte Fettsäure gibt ein Massenspektrogramm, in dem Ionen, die durch Spaltung der Bindungen des tertiären

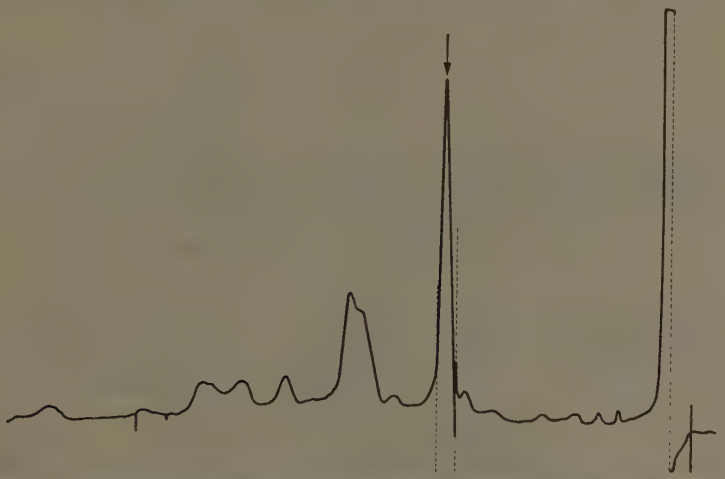


Abb. 8. Gaschromatogramm einer Estermischung aus Lagosin[8]. Methylester der C_{19}-Säure mit einem Pfeil markiert. (Nach STÄLLBERG-STENHAGEN, nicht publiziert.) (Reoplex 400; 203° C)

Kohlenstoffatoms entstehen, deutlich zu sehen sind. So zeigt der Methylester der 7-Methyl-octadecansäure (Abb. 11)[19] Ionen von m/e 157 und 129 sowie m/e 125 (= 157−32). Im letzteren Falle handelt es sich wahrscheinlich um ein Ion mit Ketenstruktur $\left[\mathrm{C}(=\mathrm{O})\mathrm{CH}-(\mathrm{CH_2})_5-\mathrm{CH}(\mathrm{CH_3})-\right]^+$.

Eine genauere Analyse des Esterspektrums der C_{20}-Säure zeigt das Vorhandensein von Methylgruppen in Stellung 3, 7, 11 und 15. Die Säure ist somit eine natürlich vorkommende Phytansäure, die wahrscheinlich aus dem Phytol des Chlorophylls durch mikrobielle Einwirkung entsteht.

Das Vorhandensein und die Stellung von Oxo-, Hydroxy- und Methoxygruppen an der Kette läßt sich massenspektrometrisch feststellen[21]. Wenn eine polare Gruppe in 2-Stellung zur Methoxycarbonylgruppe vorhanden ist, erfolgt meist glatt 1,2-Spaltung. Aus dem Methyl-

ester der 2-Oxo-octadecansäure (Abb. 12) findet Bildung von großen Mengen „Acylionen" mit m/e = 253 (= M-59) statt.

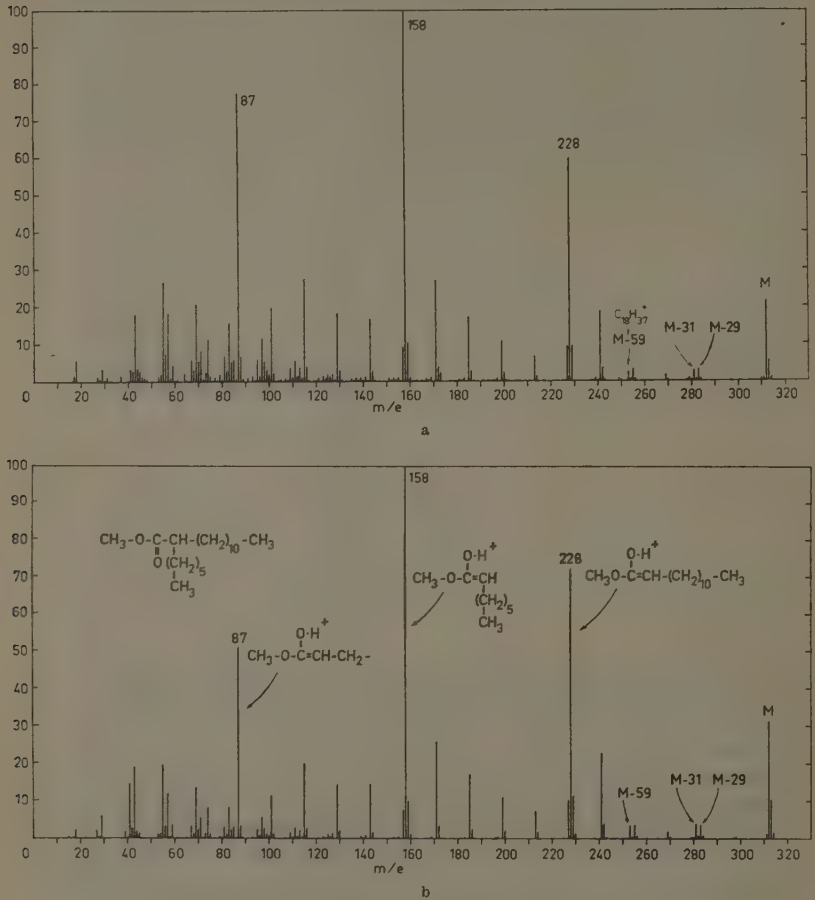


Abb. 9. a Massenspektrum des Methylesters aus Lagosin*.
b Massenspektrum des α-n-Hexyltridecansäuremethylesters*

* Das Massenspektrum ist einem Übersichtsartikel von ABRAHAMSSON, STÄLLBERG-STENHAGEN u. STENHAGEN entnommen, der für „Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids" bestimmt ist.

Der Ester einer aliphatischen Monoaminosäure gibt, wie zuerst von ANDERSSON[1] gefunden wurde, in ähnlicher Weise „Aminionen" mit m/e = M-59 (Abb. 13 a). Ionen entstehen auch durch 2,3-Spaltung und

enthalten dann sowohl eine Methoxycarbonylgruppe als auch eine Aminogruppe. Bei Methylestern haben die zuletzt genannten Ionen m/e 88 und

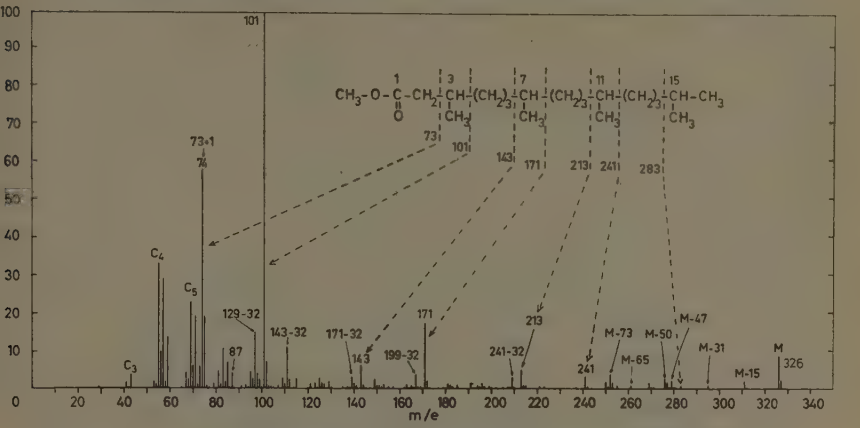


Abb. 10. Massenspektrum des Methylesters von einer C_{20}-Säure aus Butter.
(Nach BJURSTAM u. Mitarb.[7])

bei Äthylestern m/e 102. Eine Reihe von Derivaten einfacher Aminosäuren sind von ANDERSSON[1] untersucht worden. Vorläufige Mitteilungen

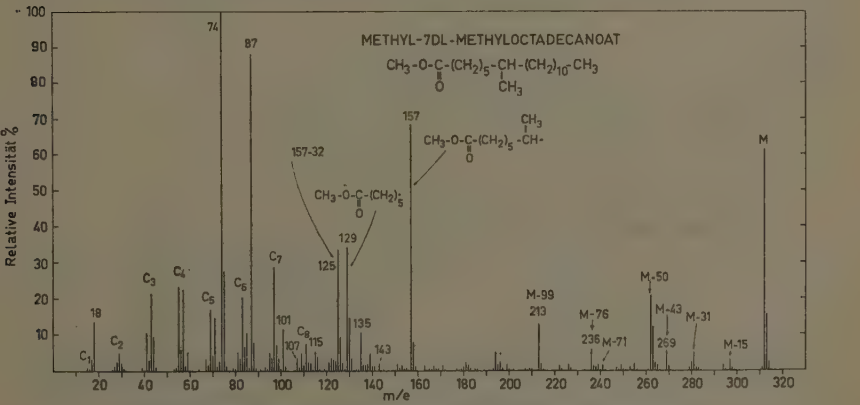


Abb. 11. Massenspektrum des Methylesters von 7-DL-Methyloctadecansäure.
(Nach RYHAGE u. STENHAGEN[10])

von massenspektrometrischen Untersuchungen an einer größeren Anzahl Aminosäureäthylester sind von BIEMANN und Mitarb.[4,6] publiziert worden.

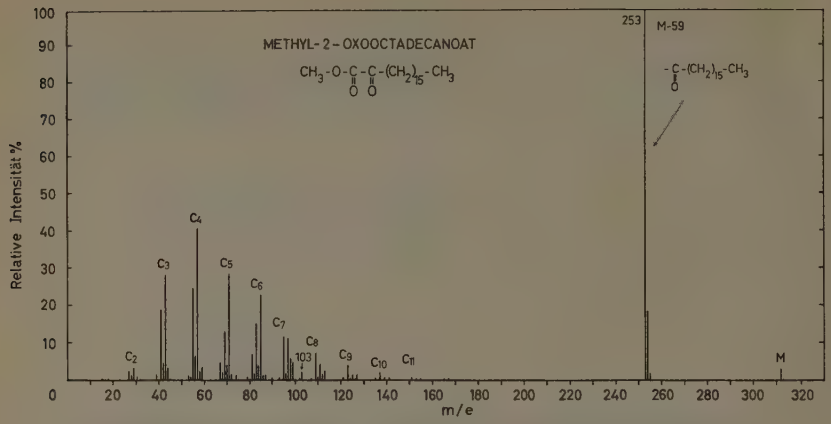


Abb. 12. Massenspektrum des 2-Ketostearinsäuremethylesters. (Nach RYHAGE u. STENHAGEN[21])

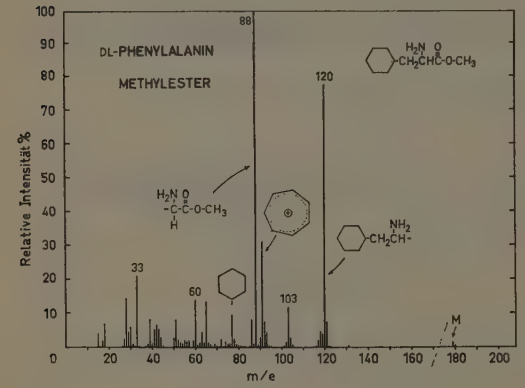


Abb. 13a

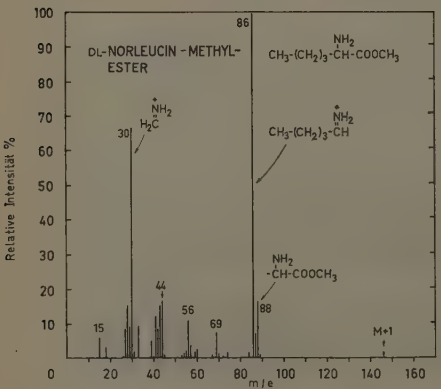
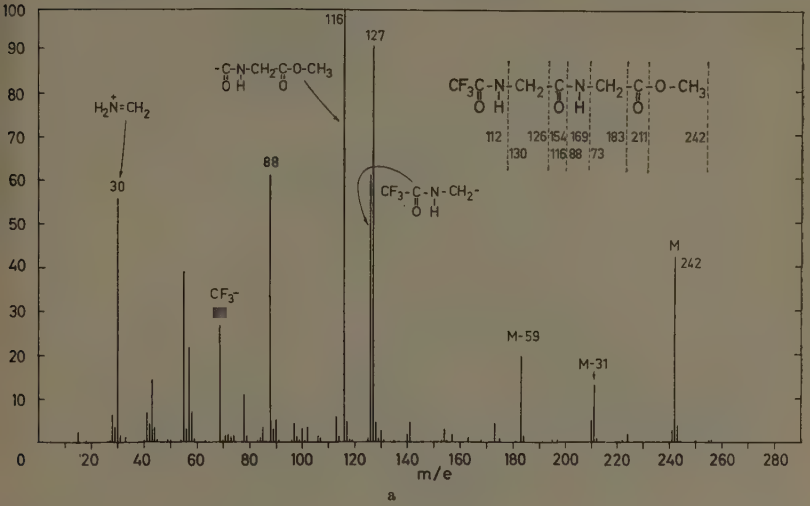


Abb. 13b

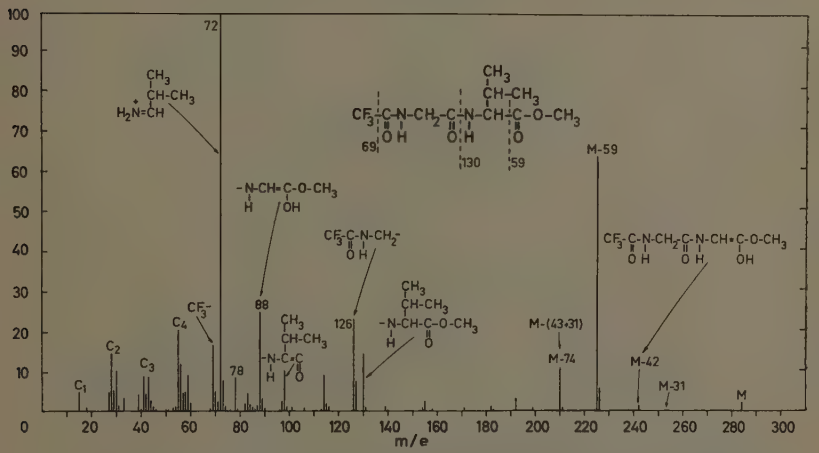
Abb. 13a und b. Massenspektra von Aminosäuremethylestern, mit 70 eV Elektronenenergie aufgenommen*.
a Methylester des DL-Norleucins;
b Methylester des DL-Phenylalanins

* Die Massenspektra der Aminosäure- und Peptidderivate sind Arbeiten von ANDERSSON, RYHAGE, STÄLLBERG-STENHAGEN u. STENHAGEN entnommen, die (in Englisch) in „Arkiv Kemi" publiziert werden

Beim Lesen einer Arbeit von WEYGAND u. Mitarb.[26] über N-Trifluoracetylverbindungen der Aminosäuren und der Peptide fiel es uns auf, daß



a



b

Abb. 14. a Massenspektrum des N-TFA-Glycylglycinmethylesters. b Massenspektrum des N-TFA-Glycyl-L-valinmethylesters

diese Verbindungen wegen guter thermischer Stabilität und verhältnismäßig hohen Dampfdruckes für massenspektrometrische Analysen

geeignet sein könnten. Der erste Versuch mit N-TFA-L-Alanyl-L-phenylalanin-methylester war erfolgreich[1]. Professor WEYGAND hat uns diese

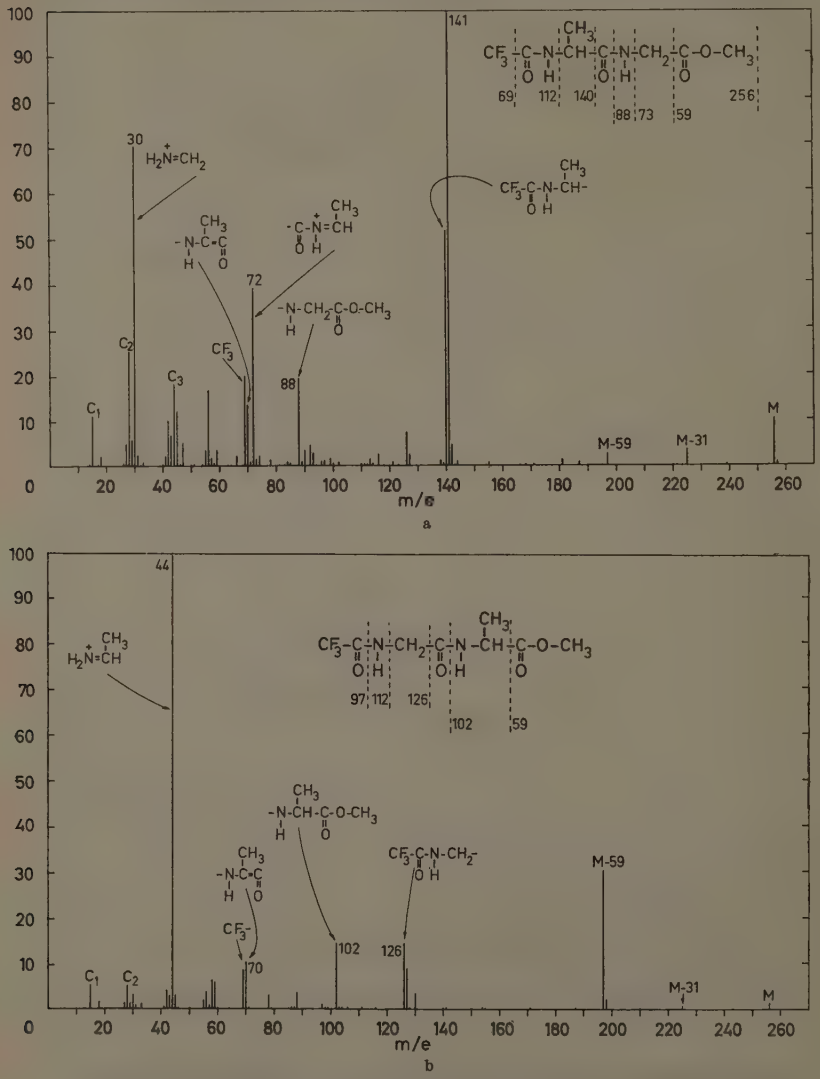


Abb. 15. a Massenspektrum des N-TFA-L-Alanylglycinmethylesters. b Massenspektrum des N-TFA-Glycyl-L-alaninmethylesters

Verbindung und später freundlicherweise eine große Anzahl von N-TFA-Peptidestern zur Verfügung gestellt. Da die Methode der Analyse von

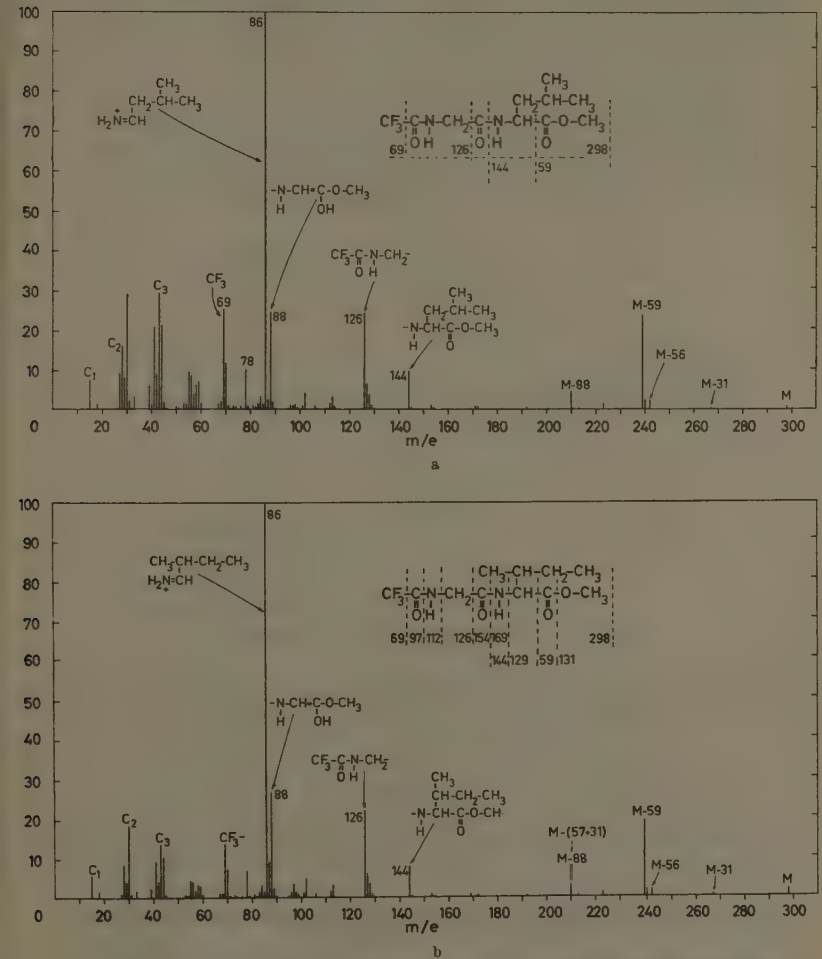


Abb. 16. a Massenspektrum des N-TFA-Glycyl-L-leucinmethylesters. b Massenspektrum des N-TFA-Glycyl-L-isoleucinmethylesters

Peptiden weniger entwickelt sind als die der Aminosäuren, war die Möglichkeit einer massenspektrometrischen Analyse von besonderem Interesse.

Das Molekulargewicht der N-TFA-Peptidester ließ sich in allen Fällen (etwa 25) direkt bestimmen. Durch das Auftreten von charakteristischen Bruchstücken in den Massenspektrogrammen können die

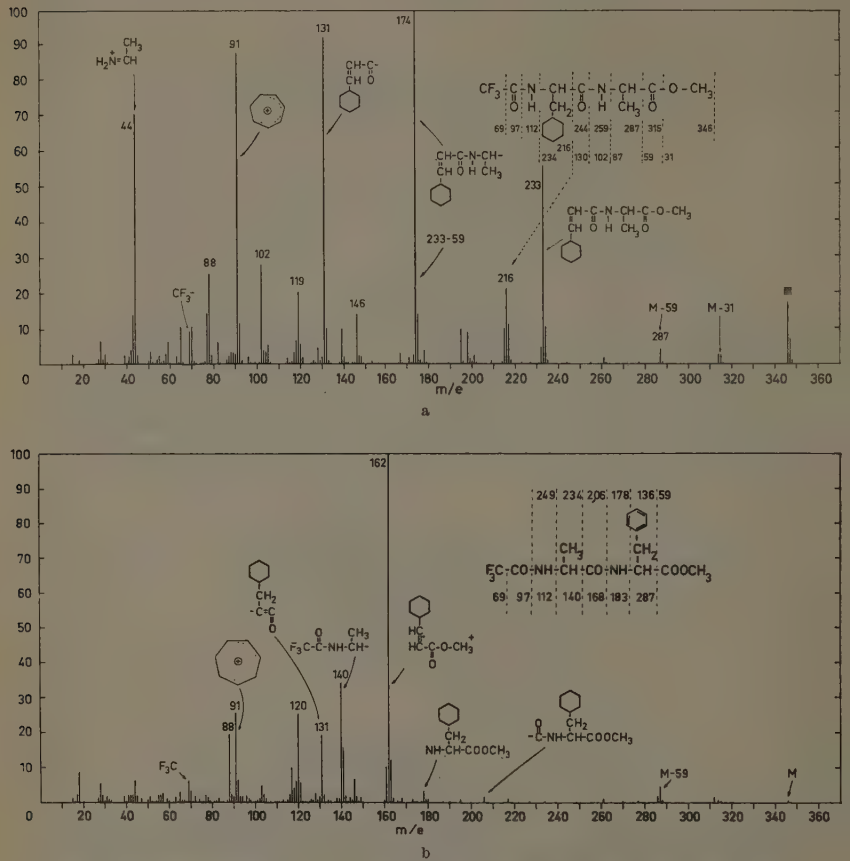


Abb. 17. a Massenspektrum des N-TFA-L-Phenylalanyl-L-alaninmethylesters. b Massenspektrum des N-TFA-L-Alanyl-L-phenylalaninmethylesters

Aminosäuren des Peptids und ihre Sequenz bestimmt werden. So gibt N-TFA-Glycylglycinmethylester (Abb. 14a) N-TFA-Ionen (m/e 126) und Aminionen (m/e 30) des Glycins, während N-TFA-Glycyl-L-valinmethylester (Abb. 14b) N-TFA-Ionen des Glycins und Aminionen des Valins (m/e 72) gibt. Daß das Peptid als Methylester vorliegt, zeigen die Ionen

mit m/e = M-31 (Verlust von $-O-CH_3$) und m/e = M-59 (Verlust von $-CO-O-CH_3$).

Von den isomeren N-TFA-Peptidestern in Abb. 15 zeigt der eine das N-TFA-Ion des Alanins (m/e 140) und das Aminion des Glycins (m/e 30), der andere das N-TFA-Ion des Glycins (m/e 126) und das Aminion des Alanins (m/e 44). Die Sequenz ist somit leicht zu bestimmen.

Dagegen scheint es schwer, N-TFA-Peptidester zu unterscheiden, die isomere Aminosäuren enthalten. Das Massenspektrum des N-TFA-Glycyl-L-leucin-methylesters (Abb. 16a) ist von dem des N-TFA-Glycyl-L-isoleucin-methylesters (Abb. 16b) nicht deutlich verschieden.

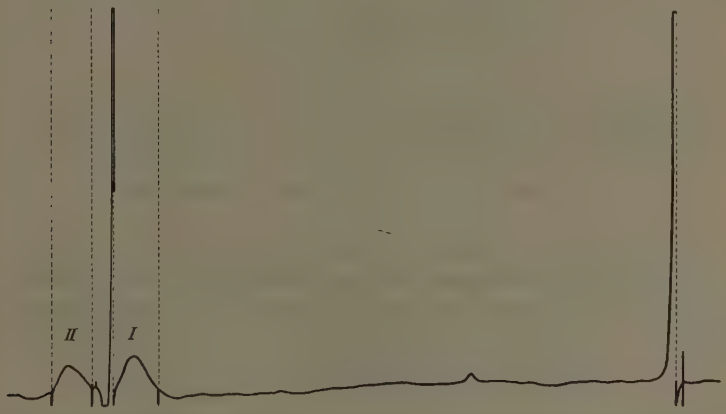


Abb. 18. Gaschromatographische Trennung von einem Gemisch stereoisomerer N-TFA-Dipeptidmethylester (N-TFA-L-Alanyl-L-phenylalaninmethylester und N-TFA-L-Alanyl-D-phenylalaninmethylester). Die vertikalen Linien links im Diagramm rühren vom Fraktionensammler her. (Nach Ställberg-Stenhagen.) (Reoplex 400; 248° C)

Abb. 17 zeigt die Massenspektrogramme der isomeren N-TFA-L-Alanyl-L-phenylalanin- und N-TFA-L-Phenylanyl-L-alanin-methylester.

Alle N-TFA-Peptidester wurden vor der massenspektrometrischen Analyse von uns gaschromatographisch* auf Reinheit geprüft. Das Gaschromatogramm des N-TFA-L-Alanyl-L-phenylalanin-methylesters zeigte dabei das Vorhandensein von zwei Komponenten (Abb. 18). Prof. Weygand hat vorgeschlagen, daß ein Gemisch der diasteroisomeren Verbindungen N-TFA-L-Alanyl-L-phenylalanin-methylester und N-

* Die gaschromatographische Arbeit wurde in Göteborg von Dr. S. Ställberg-Stenhagen ausgeführt. Inzwischen wurde von Weygand u. Mitarb.[27] über gaschromatographische Untersuchungen von N-TFA-Peptidestern berichtet.

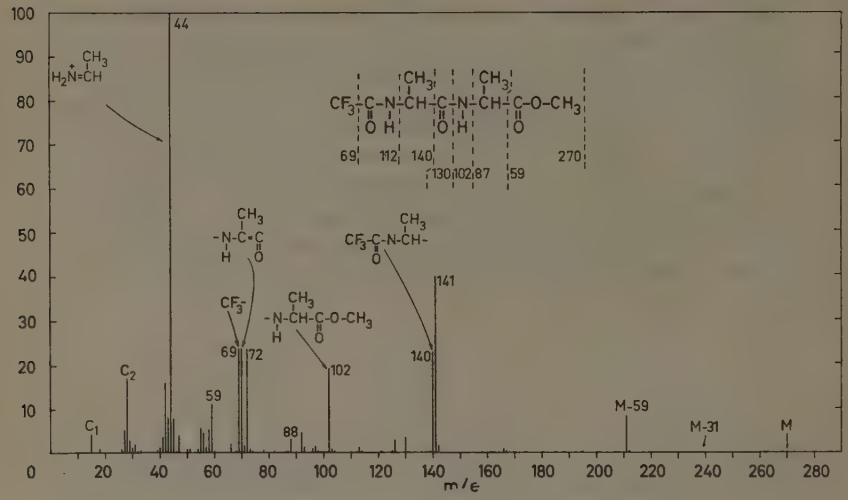


Abb. 19. a Massenspektrum des N-TFA-L-Alanyl-L-alaninmethylesters

TFA-L-Alanyl-D-phenylalanin-methylester vorliegen könnte, da das bei der Synthese verwendete L-Phenylalanin nicht frei von D-Phenylalanin war. Die beiden Komponenten wurden daher gaschromatogra-

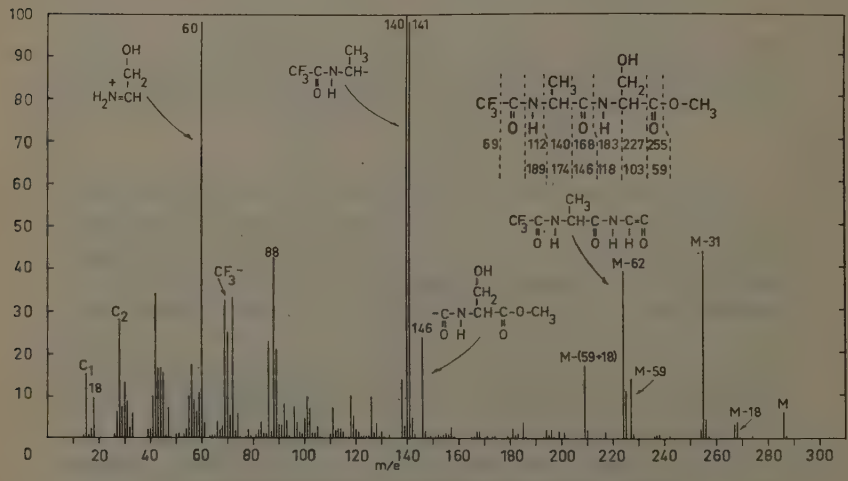


Abb. 19. b Massenspektrum des N-TFA-L-Alanyl-L-serinmethylesters

phisch isoliert. Die Komponenten gaben dasselbe Massenspektrogramm (Abb. 17b), was mit dem Vorhandensein eines Gemisches der Diastereoisomeren im Einklang steht, da die Massenspektrogramme Diastereoisomerer dieser Art keine Unterschiede aufweisen[20]. Das Massenspektrogramm des N-TFA-L-Alanyl-L-serin-methylesters (Abb. 19b) zeigt das N-TFA-Ion des Alanins (m/e 140) und ein Aminion von m/e 60. Dieses Aminion enthält also die Hydroxylgruppe.

Der Tripeptidester N-TFA-L-Valylglycyl-L-alaninmethylester (Abb. 20) gibt das Aminion des Alanins (m/e 44) und Glycins (m/e 30)

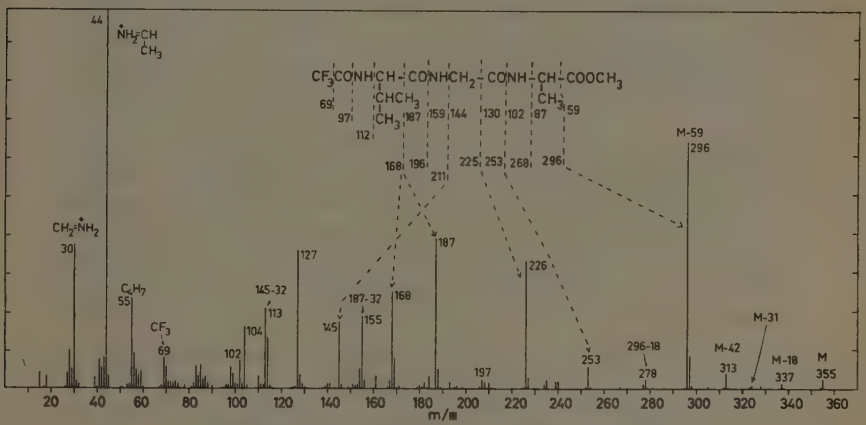


Abb. 20. Massenspektrum des N-TFA-L-Valylglycyl-L-alaninmethylesters

und das N-TFA-Ion des Valins (m/e 168) zusammen mit einer Reihe von anderen Bruchstücken. Die Struktur des Tripeptids läßt sich unschwer ableiten.

Biemann, Seibl u. Gapp[5] haben in einer vorläufigen Mitteilung über massenspektroskopische Analyse von Polyaminalkoholen berichtet. Die Polyaminalkohole wurden durch Reduktion der Peptide oder der N-Acetylpeptidester mit $LiAlH_4$ oder $LiAlD_4$ erhalten. Auch in dieser Weise läßt sich die Sequenzanalyse von Peptiden ausführen.

Literatur

[1] Andersson, C.-O.: Acta chem. scand. **12**, 1353 (1958); die weitere Veröffentlichung erfolgt in Ark. Kemi. — [2] Beynon, J. H.: Mass Spectrometry and its Applications to Organic Chemistry, Elsevier Publ. Co., Amsterdam 1960. — [3] Beynon, J. H.: Mikrochim. Acta (Wien) **1956**, 437; vgl. diese Z. **154**, 135 (1957). — [4] Biemann, K., J. Seibl u. F. Gapp: Biochem. biophysic. Res. Commun. **1**, 307 (1959). — [5] Biemann, K., J. Seibl u. F. Gapp: J. Amer. chem. Soc. **81**, 2274 (1959). — [6] Biemann, K., u. W. Vetter: Biochem. biophysic. Res. Commun. **2**,

93 (1960). — [7] Bjurstam, N., B. Hallgren, R. Ryhage u. S. Ställberg-Stenhagen: noch nicht publiziert. — [8] Demarteau-Ginsburg, H., E. Lederer, R. Ryhage, S. Ställberg-Stenhagen u. E. Stenhagen: Nature (London) **183**, 1117 (1959). — [9] Dhar, M. L., V. Thaller, M. C. Whiting, R. Ryhage, S. Ställberg-Stenhagen u. E. Stenhagen: Proc. chem. Soc. (London) **1959**, 154. — [10] Dinh, Ng., R. Ryhage, S. Ställberg-Stenhagen u. E. Stenhagen: ASTM E-14 Meeting, Atlantic City, June 1960; wird in Ark. Kemi veröffentlicht. — [11] Ewald, H., u. H. Hintenberger: Methoden und Anwendungen der Massenspektroskopie, Verlag Chemie, Weinheim 1953. — [12] Hansen, R. P., u. F. B. Shorland: Biochemic. J. **50**, 358 (1951/52). — [13] Happ, G. P., u. D. W. Stewart: J. Amer. chem. Soc. **74**, 4407 (1957). — [14] McLafferty, F. W., in: Advances in Mass Spectrometry, Pergamon Press, London 1959, S. 355. — [15] McLafferty, F. W.: Analyt. Chemistry **28**, 306 (1956); vgl. diese Z. **153**, 117 (1956). — [16] McLafferty, F. W.: Appl. Spectroscopy **11**, 148 (1957). — [17] Ryhage, R.: Ark. Kemi **13**, 475 (1959); **16**, 19 (1960); vgl. diese Z. **172**, 141 (1960). — [18] Ryhage, R., u. E. Stenhagen: Ark. Kemi **13**, 523 (1959). — [19] Ryhage, R., u. E. Stenhagen: Ark. Kemi **15**, 291 (1960). — [20] Ryhage, R., u. E. Stenhagen: Ark. Kemi **15**, 333 (1960). — [21] Ryhage, R., u. E. Stenhagen: Ark. Kemi **15**, 545 (1960). — [22] Ryhage, R., u. E. Stenhagen: „Mass Spectrometry in Lipid Research", J. Lipid Res. **1**, 361, (1960). — [23] Stenhagen, E.: Verhandlungen der Niende Nordiske Kemikermöde, Aarhus 1956, Bd. II, S. 59. — [24] Thomson, Sir J. J.: Rays of Positive Electricity and their Application to Chemical Analysis, Longmans, Green and Co., London 1913. — [25] Wahrhaftig, A. L., in: Advances in Mass Spectrometry, Pergamon Press, London 1959, S. 274. — [26] Weygand, F., R. Geiger u. W. Swodenk: Angew. Chem. **68**, 307 (1956). — [27] Weygand, F., B. Kolb, A. Prox, M. A. Tilak u. I. Tomida: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **322**, 38 (1960).

Prof. Dr. E. Stenhagen, Institut für medizinische Biochemie, Medicinaregatan 9, Göteborg (Schweden)

Messung der Absolutintensität der Röntgenkleinwinkelstreuung von Kolloidteilchen und Makromolekülen zur Bestimmung ihrer Größe und Gestalt

Von

O. Kratky [1]

(Referat)

Unter Absolutintensität verstehen wir das Verhältnis der gestreuten Strahlung zur Intensität des Primärstrahls. Es ergeben sich experimentelle Schwierigkeiten aus dem Umstand, daß die Primärintensität um mehrere Größenordnungen intensiver ist als die Streuung. Die Schwierig-

[1] Vgl. auch Angew. Chem. **72**, 467 (1960). — Eine ausführliche Arbeit wird in dieser Z. erscheinen.

keit bei Verwendung von Zählrohren die 10^7—10^8 Impulse zu zählen, die je Sekunde den Primärstrahl durchsetzen, wird durch einen Rotator mit kleinem Loch überwunden, der eine entsprechende Schwächung bewirkt. Beim photographischen Verfahren bewährt sich eine Vorrichtung zur gleichmäßigen Verschiebung des Films bei der Exposition des Primärstrahls. Aus der Absolutintensität können, unabhängig von der Gestalt der Streukurve, wertvolle Angaben über gelöste Moleküle gewonnen werden und zwar:

1. Molekulargewicht bei homodispersen Lösungen bzw. Gewichtsmittel des Molekulargewichtes bei polydispersen Lösungen. Dies mit der Einschränkung, daß es sich um Makromoleküle handelt. Ergebnisse liegen an Proteinmolekülen vor.

2. Sekundärstruktur von Fadenmolekülen, d.h. Verknäuelungsgrad. Ergebnisse an natürlichen und synthetischen Fadenmolekülen werden besprochen.

3. Bestimmung der Masse je Längeneinheit bei Fadenmolekülen. Die Angabe ermöglicht z. B. Aussagen über regelmäßige Faltungen (Unterscheidung zwischen gestreckter und regelmäßig gefalteter Form bzw. Helix.) Messungen an synthetischen Polypeptiden und natürlichem Seidenfibroin.

Prof. Dr. O. KRATKY,
Institut f. physikal. Chemie d. Universität Graz, Graz, Halbärthgasse 5 (Österreich)

Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen

Über die IR-Absorption von Purinkörpern im Bereich 15—24 μ*

Von
SIEGMAR LÄUFER

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 12. November 1960)

Wegen der großen biochemischen Bedeutung gewisser Purine ist die Absorption dieser Stoffklasse im UV häufig Gegenstand eingehender Bearbeitung gewesen. Diese Methode hat auch mit Erfolg Anwendung bei der Bestimmung von Tautomeriebeziehungen (Lactam-Lactim-Tautomerie) gefunden[3].

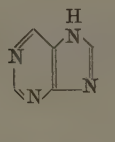
Prinzipiell gilt für die IR-Absorption der Purine das gleiche, doch treten hier öfters Schwierigkeiten auf, die eine eindeutige Zuordnung zur

* Auszugsweise vorgetragen auf der 6. Arbeitstagung der Deutschen Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung in Tübingen vom 2. bis 4. Oktober 1958.

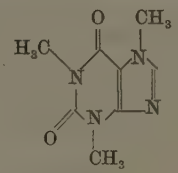
Lactam- oder Lactimform manchmal unmöglich machen[1]. Der Grund hierfür liegt darin, daß in zahlreichen Fällen im entscheidenden 6 μ-Bereich eine ganze Reihe von Koinzidenzmöglichkeiten verschiedener Absorptionsbanden besteht, die eine sichere Zuordnung verhindert. Diesem Übel wird nur teilweise dadurch Abhilfe geschaffen, daß in einigen Fällen die IR-Absorption im 3 μ-Bereich eine ausreichende Information zur Beantwortung der gestellten Frage liefern kann[2].

Wir haben daher vor einiger Zeit die Absorption einer größeren Anzahl von Purinkörpern im bisher noch wenig beachteten Infrarotbereich von 15—24 μ untersucht, worüber im folgenden berichtet werden soll.

Die Purinkörper lassen sich einteilen in zwei große Gruppen, nämlich solche, in denen das aromatische Purinsystem voll erhalten bleibt (I, Purintyp) und solche, die unter teilweiser oder völliger Aufhebung des aromatischen Systems Lactamstruktur besitzen (II, Purinalkaloid-Typ):



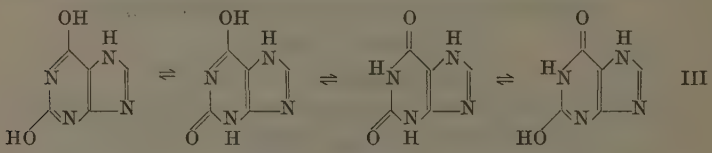
I



II

Purin Coffein

Zusätzlich kann man noch eine dritte Gruppe herausheben, für die formal die Möglichkeit besteht, sowohl in der aromatischen Struktur (Typ I) als auch in der Lactamstruktur (Typ II) zu existieren, wobei im Falle mehrerer Hydroxylfunktionen auch Mischformen denkbar sind:



III

Als Beispiel sei das Xanthin angeführt, für das rein formal 4 verschiedene Formen möglich sind (III). Entsprechendes gilt für die Einführung einer zusätzlichen Sauerstoffunktion in den Imidazolring (Harnsäure). Auf diese dritte Gruppe soll hier nicht näher eingegangen werden.

In den Infrarotspektren der Purine sind besonders charakteristisch für den Typ I intensive Banden (2—4) zwischen 6,1—6,4 μ, die den Ringvalenzschwingungen des aromatischen Systems zukommen, während der Typ II an der charakteristischen Bande der Lactamgruppierung erkennbar ist, die bei den Purkinalkaloiden zwischen 5,8 und 6,1 μ (häufig aufgespalten) liegt. Diese einfachen Beziehungen sind aber — wie schon oben angedeutet — mannigfaltigen Störungen ausgesetzt.

Werden z.B. in das Ringsystem Substituenten eingefügt, so kann sich für die Erkennung der Verbindungen des Typs I z.B. die Absorption von gewissen Phenylkörpern oder Pyridinkernen, kurz aller möglicher aromatischer Systeme störend bemerkbar machen, während im Falle von Typ II gewisse Carbonylstrukturen, soweit sie im Frequenzbereich der Lactambanden liegen, große Verwirrung anstiften können. Eine weitere Schwierigkeit bedingt die — bei manchen Aminoverbindungen sehr intensive — NH-Deformationsschwingung, die ebenfalls im angeführten Bereich von 1650 cm^{-1} abwärts auftreten kann.

Die geschilderten Überlagerungsmöglichkeiten von Banden verschiedenen Ursprungs und die dadurch bedingten Schwierigkeiten entfallen im Absorptionsbereich von 15—24 μ (Dispersionsgebiet des KBr-Prismas).

Die Purine vom Typ I und die Purinalkaloide vom Typ II zeigen zwischen 15 und 24 μ ein voneinander völlig verschiedenes, für ihren Typ jeweils charakteristisches Infrarotspektrum. In Abb. 1 sind Purin und Coffein als typische Vertreter dieser beiden Gruppen gegenübergestellt. Verallgemeinernd läßt sich sagen, daß Purine mit vollaromatischem Pyrimidin- und Imidazolsystem die intensivste Bande in der Nähe von 16 μ aufweisen, während Purine mit Lactamstrukturen im Pyrimidinring* ihre intensivsten Banden im Bereich zwischen 19 und 22 μ haben.

Das soll an den folgenden Beispielen, die nur eine Auswahl aus einer großen Anzahl darstellen, gezeigt werden.

Das unsubstituierte Purin (Abb. 1 oben) zeigt eine intensive Bande bei 16,4 μ, eine mittelstarke bei 17,5 μ und eine schwache bei 22 μ.

Wie die folgenden Spektren (Abb. 2) zeigen, bewirkt Substitution in 6-Stellung folgende Veränderungen:

1. Die intensive Purinbande bei 16,4 μ wird durch die Substitution meist aufgespalten und außerdem nach kürzeren Wellenlängen verschoben, so daß sie jetzt zwischen 15 und 16 μ erscheint.

2. Es treten zusätzlich eine oder mehrere schwache Banden im Bereich von 17—20 μ auf.

3. Die langwellige schwache Bande verschwindet ganz.

Bei Halogen- oder Schwefelsubstitution wird das Spektrenbild etwas komplizierter, da nun auch die Valenzschwingungen der C-Cl, C-Br und C-S Bindungen in diesem Bereich auftreten können. Im ganzen bleibt aber der Charakter des Spektrenbildes erhalten, wie man an den Beispielen 6-Chlorpurin und 6-Methylmercaptopurin sieht. In der Absorption dem letzteren ziemlich ähnlich ist das 6-Mercaptopurin. Die C-Cl-Schwingung im 6-Chlorpurin ist unter den langwelligen Banden der intensivsten Bandengruppe zu suchen. Für diese Zuordnung beweisend

* Verbindungen mit Lactamstruktur im Imidazolring bei Erhaltung des aromatischen Systems im Pyrimidinring wurden von uns nicht untersucht.

sind auch das darunter stehende Spektrum des 6-Methylmercaptopurins mit C-S-Valenzschwingung bei 16,5 μ und das Spektrum des 6-Mercaptopurins mit C-S-Valenzschwingung bei 16,8 μ. Auch bei komplizierter gebauten Substituenten bleibt das charakteristische Bandenbild im 15 bis 16 μ-Bereich im wesentlichen erhalten, wie aus den beiden unteren Spektren in Abb. 2 entnommen werden kann.

Die Spektren der beiden letzten Verbindungen sind noch aus einem besonderen Grunde interessant. Beide Verbindungen besitzen in der Seitenkette eine Säurehydrazid- bzw. Säuregruppe. Es ist bemerkenswert, daß diese Carbonylfunktionen, jedenfalls in der vorliegenden Konzentration nicht, bzw. nur sehr wenig zur Absorption im betrachteten Bereich beitragen, sie zeigen praktisch Transparenz. Das gleiche gilt auch für andere Carbonylfunktionen.

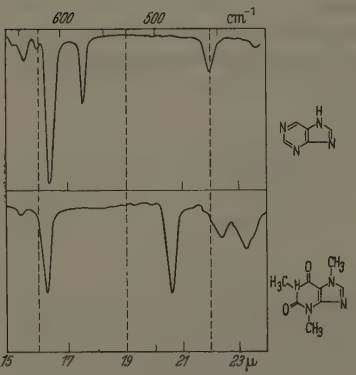


Abb. 1. Infrarotspektren von Purin und Coffein

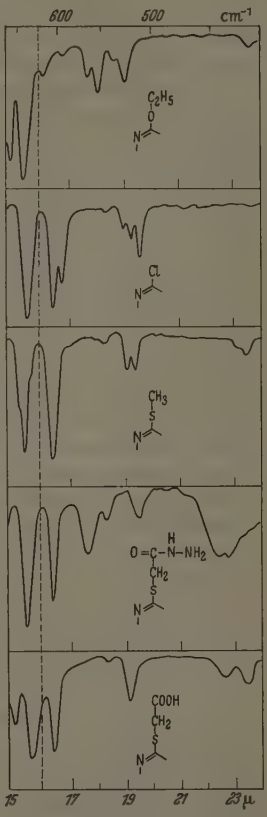


Abb. 2. Infrarotspektren von in 6-Stellung substituierten Purinen

Dadurch ist es möglich, cyclische Lactamstrukturen auch dann zu erkennen, wenn ihre Amidbande bei 6 μ z. B. von den Valenzschwingungsbanden anderer Doppelbindungen überlagert ist. Die letzteren werden im langwelligen Bereich zwischen 15 und 24 μ sozusagen „herausgefiltert" und übrig bleiben nur die intensiven Banden cyclischer Lactame, die man

wohl auf eine Ringschwingung, deren Frequenz durch die cyclische Carbonylfunktion bestimmt wird, zurückführen darf.

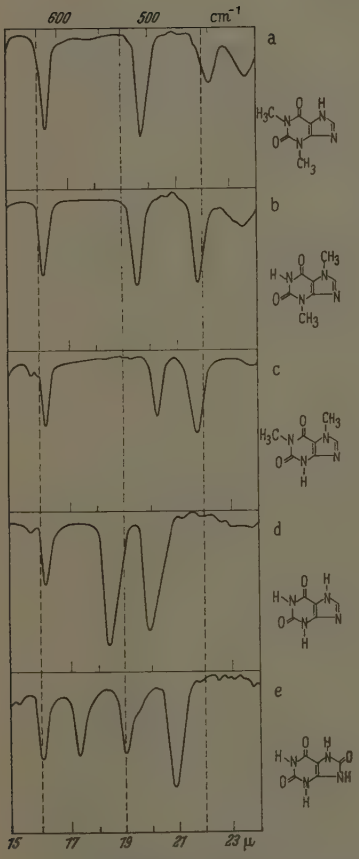


Abb. 3

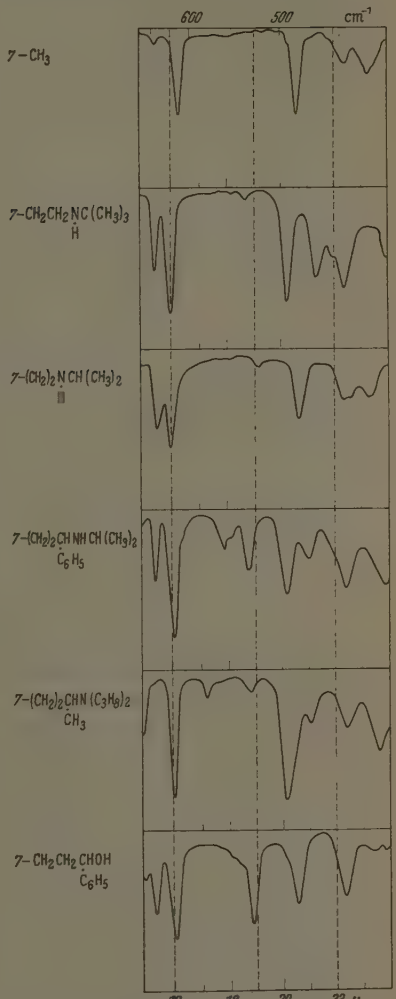


Abb. 4

Abb. 3. Infrarotspektren von Theophyllin (a), Theobromin (b), Paraxanthin (c), Xanthin (d) und Harnsäure (e)

Abb. 4. Infrarotspektren von in 7-Stellung substituierten Theophyllinen

Die besonders interessierenden Banden im Bereich von 15—16 μ treten bei allen Purinen, die am Imidazolring keine kettenförmige Substitution tragen, immer dann und nur dann auf, wenn das aromatische System im Pyrimidinring noch erhalten ist, also auch bei allen Derivaten mit Substituenten im Pyrimidinteil des Purins. Sie erscheinen nicht mehr an dieser Stelle, wenn der 6-Ring Lactamstrukturen enthält. Ein gutes Beispiel ist die Gruppe der Purinalkaloide:

Die Spektren des Coffeins (Abb. 1 unten), Theophyllins, Theobromins und Paraxanthins (Abb. 3a—c) zeigen keine Banden zwischen 15 und 16 μ. Die erste starke Bande, die vergleichbar mit der intensivsten Bande des unsubstituierten Purins bei 16,4 μ ist, liegt wenig oberhalb von 16 μ im Bereich 16,1—16,3 μ. Wichtig ist, daß sie nun nicht mehr die intensivste Bande im Spektrum ist, sondern von anderen Banden bei längeren Wellen, und zwar bei 19—22 μ, an Intensität übertroffen wird oder wenigstens erreicht wird. Die intensiven, langwelligen Banden sind auf die in diesen Verbindungen vorhandenen Lactamstrukturen zurückzuführen.

Eine solche Gesetzmäßigkeit sollte aber letzten Endes auch eine Entscheidung zugunsten der Lactam- oder Lactimform bei tautomeriefähigen Verbindungen (Typ III, siehe oben) ermöglichen. Das scheint tatsächlich der Fall zu sein, wie die Spektren des Xanthins (Abb. 3d) und der Harnsäure (Abb. 3e) zeigen, denen in festem Zustande nach dem vorausgegangenen die Lactamform zukommt.

Trägt der Imidazolring der Purinalkaloide eine längere Kette, so treten Abweichungen vom geschilderten Spektrenbild auf. Sie sind bei Substitution in 8-Stellung größer als in 7-Stellung.

In 7-Stellung substituierte Theophylline sollten im IR-Spektrum dem Coffein (7-Methyltheophyllin) ähnlicher sein als ihrer Stammsubstanz. Das trifft tatsächlich zu, wie aus Abb. 4 ersichtlich ist. Charakteristisch für ihre Lactamstruktur bleiben auch hier die starken Banden zwischen 19 und 22 μ. Bemerkenswert ist die Lagekonstanz der intensiven Bande bei 16 μ. Ähnlich wie bei manchen substituierten Purinen ohne Lactamstruktur wird sie aber häufig von einer meist weniger intensiven Bande zwischen 15 und 16 μ begleitet.

Auch die Salze 7-substituierter Theophylline mit basischer Seitenkette fügen sich in dies Schema ein. Bei diesen ist zu beachten, daß die intensiven Banden um 19—22 μ beim Übergang von der Base zum Salz in ihrer Intensität häufig geschwächt werden. Sie bleiben jedoch immer noch stark genug, um die Lactamstruktur erkennen zu lassen.

Es lag die Vermutung nahe, daß Pyrimidinringsysteme ähnliche Gesetzmäßigkeiten bergen sollten. Das scheint tatsächlich der Fall zu sein, wie wir durch einige Messungen leicht feststellen konnten. Vor einiger Zeit haben Short u. Thompson[4] viele Pyrimidine vermessen, davon eine Anzahl im Bereich von 15—24 μ, haben sich aber in der Diskussion

auf den Bereich von 2—15 μ beschränkt. Eine Durchsicht ihrer Spektren hat ergeben, daß die von uns hervorgehobenen Banden auch für die Bestimmung der Tautomerie von Pyrimidinderivaten brauchbar sein könnten, wobei die Pyrimidinfrequenzen gegenüber denjenigen der Purine etwas verschoben sind.

Den Firmen Schering AG, Berlin und Zellstoff-Waldhof, Mannheim, danke ich für die Überlassung von Purinderivaten, Herrn W. ROY habe ich zu danken für die Aufnahme der IR-Spektren*.

Zusammenfassung

Die IR-Absorption von Purinderivaten im Dispersionsbereich des KBr-Prismas kann sowohl zur analytischen Bestimmung einzelner Komponenten in Gemischen als auch zur Konstitutionsbestimmung (Lactam- oder Lactimform) Verwendung finden. So lassen sich Carbonylstrukturen im Purinring leicht erkennen, selbst wenn bei Kettensubstitution in der Kette ähnliche Strukturelemente vorkommen.

Literatur

[1] BELLAMY, L. J.: The Infra-Red Spectra of Complex Molecules, Verlag Methuen & Co., Ltd., London, 2. Aufl. 1958, S. 282; dort weitere Literatur. — [2] BROWNLIE, I. A.: J. chem. Soc. (London) **1950**, 3062. — [3] CAVALIERI, L. F., H. BENDICH, J. F. TINKER u. G., B. BROWN: J. Amer. chem. Soc. **70**, 3875 (1948). — [4] SHORT, L. N., u. H. W. THOMPSON: J. chem. Soc. (London) **1952**, 168.

Dr. SIEGMAR LÄUFER, Degussa, Werk Rheinfelden/Baden, Schließfach 68
(früher: BFA für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen)

Physikalisch-chemisches Institut der Universität Freiburg i.Br.

Zur Existenz des 1, 2, 3, 4-Thiatriazol-Ringgerüsts

I. Mitteilung über die Umsetzung von Thiosemicarbaziden mit salpetriger Säure**

Von

MANFRED KUHN*** und REINHARD MECKE

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 7. Dezember 1960)

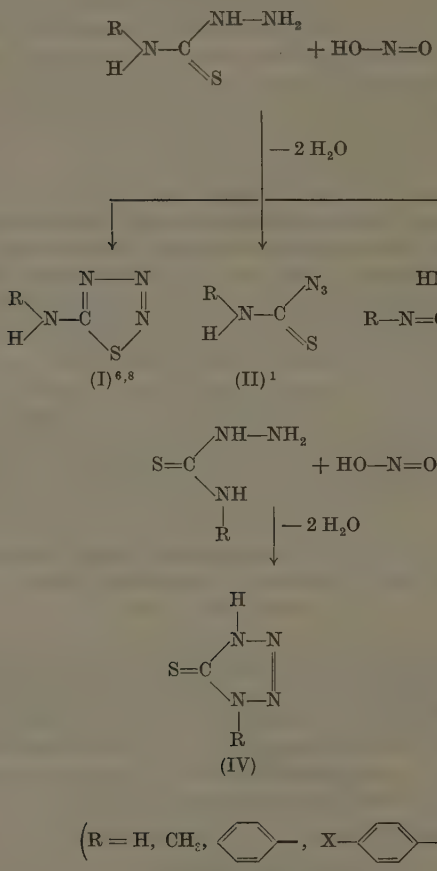
Die Struktur der aus Thiosemicarbaziden und salpetriger Säure darstellbaren Substanzen war schon mehrfach Gegenstand eingehender chemischer Untersuchungen[1,6,8], wobei die Strukturen (I) bis (III) vor-

* Sämtliche Substanzen fest, in KBr, aufgenommen mit dem selbstregistrierenden IR-Spektrographen der Fa. Ernst Leitz, GmbH, Wetzlar, ausgerüstet mit KBr-Prisma.

** Teil der Dissertation M. KUHN, Freiburg i. Br. 1960.

*** Neue Anschrift: Deutsches Forschungsinstitut für Textilindustrie Reutlingen-Stuttgart.

geschlagen und diskutiert wurden:



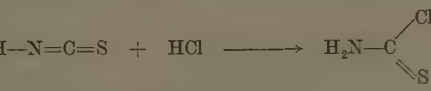
$$\left(R = H,\ CH_3,\ \bigcirc\!\!-,\ X-\bigcirc\!\!-\right)$$

Außerdem wäre auch denkbar, daß die H-Atome in 1- und 4-Stellung des Thiosemicarbazids reagieren, wobei dann das 1,4-Dihydrotetrazolthion-5 (IV) zu erwarten wäre.

Obwohl LIEBER u. Mitarb.[8] neuerdings eine größere Zahl substituierter Thiosemicarbazide mit salpetriger Säure umgesetzt haben und auf Grund ihrer Ergebnisse die Thiatriazol-Struktur (I) bevorzugen, liegt bis heute kein exakter Beweis für eine der Strukturen (I) bis (IV) vor. Diesen Beweis zu führen, war daher Ziel der vorliegenden Untersuchungen.

IR-spektroskopische Untersuchungen

An Hand des IR-Spektrums (Abb. 1) der aus Thiosemicarbazid und salpetriger Säure dargestellten, kristallisierten Substanz (R = H) ist die Struktur eines Thiocarbaminsäure-azids (II) eindeutig auszuschließen. Dies ergibt sich aus dem Fehlen der für die Azidgruppe charakteristischen Frequenz bei etwa 2200 cm^{-1} (ω_a N=N=N). Auch das zu Vergleichszwecken nach BATTEGAY u. HÉGAZI[2] dargestellte Thiocarbaminsäurechlorid (V)



(V)

zeigt an Hand seines IR-Spektrums (Abb. 2) im Molekülbau keinerlei Verwandtschaft mit der in Abb. 1 dargestellten Substanz. Nach Ausschluß

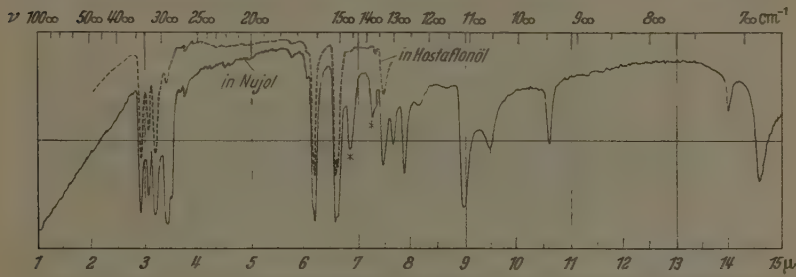


Abb. 1. IR-Spektrum der aus Thiosemicarbazid und salpetriger Säure dargestellten Substanz (Aufnahmetechnik: Nujol- und Hostaflonöl-Suspension)

der Azidstruktur (II) ist im folgenden noch zwischen den drei verbleibenden Ringstrukturen (I), (III) und (IV) zu entscheiden.

Bei der Umsetzung des 4-Methylthiosemicarbazids mit salpetriger Säure erhält man nach FREUND u. Mitarb.[6] ebenfalls eine kristallisierte Substanz (R = CH_3), deren IR-Spektreum (Abb. 3) das Vorliegen einer NH-Gruppe (ν NH = 3195 cm^{-1}) wahrscheinlich macht. Mit diesem Befund ist jedoch noch keine Entscheidung zwischen den fraglichen Strukturen (I), (III) und (IV) möglich.

Vergleicht man des weiteren die IR-Spektren Abb. 1 und Abb. 3 zwischen 1—15 μ, dann läßt sich unschwer erkennen, daß offenbar in beiden Fällen dasselbe Ringgerüst vorliegt. Wenn es daher gelänge, im IR-Spektrum Abb. 1 eine NH_2-Gruppe nachzuweisen, dann wäre bewiesen, daß beiden Substanzen (R = H bzw. R = CH_3) die Thiatriazolstruktur (I) zukommt. Im IR-Spektrum Abb. 1 könnte man in der Tat die Frequenzen 3257 cm^{-1} und 3413 cm^{-1} (ν_s NH_2 und ν_a NH_2) sowie 1621 cm^{-1} (δ NH_2) einer NH_2-Gruppe zuordnen. Allerdings ist dies nicht

mit der für einen Strukturbeweis notwendigen Sicherheit möglich, da im Bereich der NH_2-Valenzschwingungen auch Kombinations- und Oberschwingungen ähnlicher Intensität zu erwarten sind (z.B. 3135 cm^{-1} $\approx$ 1514 + 1621 cm^{-1} oder 3257 cm^{-1} $\approx$ 2 · 1621 cm^{-1}). Dann wäre allerdings 1621 cm^{-1} nicht als NH_2-Deformationsfrequenz, sondern als höchste

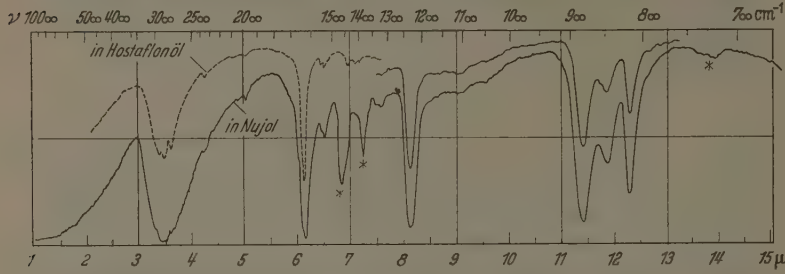


Abb. 2. IR-Spektrum des Thiocarbaminsäurechlorids, H_2N-CS-Cl (Nujol- und Hostaflonöl-Suspension)

Ringfrequenz zuzuordnen. Eine Entscheidung durch Deuterieren mit D_2O ist hier nicht möglich, da das Reaktionsprodukt aus Thiosemicarbazid und salpetriger Säure in wäßriger Lösung in Stickstoff, Schwefel und Cyanamid bzw. Dicyanamid zerfällt.

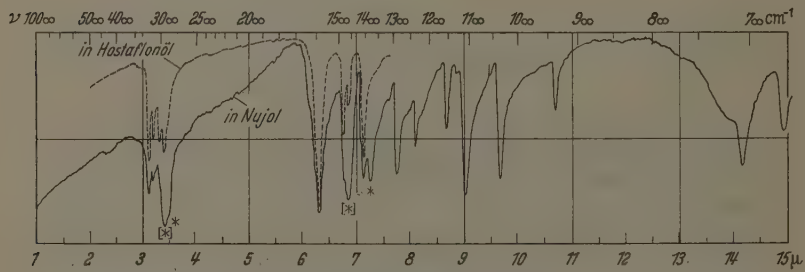
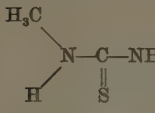


Abb. 3. IR-Spektrum der aus 4-Methylthiosemicarbazid und salpetriger Säure dargestellten Substanz (Nujol- und Hostaflonöl-Suspension). Man beachte besonders unterhalb 1600 cm^{-1} die Übereinstimmung mit dem IR-Spektrum der Abb. 1

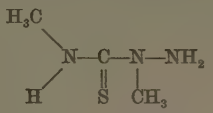
Wir versuchten deshalb, die Aminogruppe auf chemischem Weg nachzuweisen, hatten jedoch keinen Erfolg. Insbesondere erhielten wir mit Aldehyden keine Schiffschen Basen; beim Versuch, die genannte Substanz zu diazotieren, konnte lediglich Zersetzung unter Stickstoffabspaltung festgestellt werden. Dieser Befund ist jedoch wiederum nicht beweisend, da auch eine Ringsprengung unter Stickstoffentwicklung eingetreten sein könnte.

Kernresonanzspektroskopische Untersuchungen[4]

Während die Azidstruktur (II) auf Grund des IR-Spektrums eindeutig ausgeschlossen werden konnte, sind die Strukturen (III) und (IV) mit dem erhaltenen Protonenresonanzspektrum unvereinbar[5]. Man beobachtet nämlich im Bereich der CH_3-Signale bei 4-Methyl- und 2,4-Dimethyl-thiosemicarbazid (VI und VII),

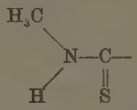


(VI)

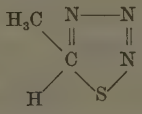


(VII)

also bei Substanzen, die die Gruppierung



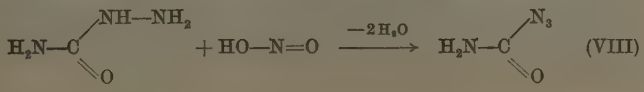
enthalten, eine Aufspaltung des CH_3-Signals, die sich nur als Spin-Spin-Kopplung mit dem benachbarten Proton deuten läßt (vgl. Englert[4], Abb. 1). Diese Aufspaltung ist darüber hinaus unabhängig von der magnetischen Feldstärke. Derselbe Befund ergibt sich nun auch für die aus 4-Methylthiosemicarbazid und salpetriger Säure dargestellte Substanz, der somit nur die Struktur eines 5-Methylamino-1,2,3,4-thiatriazols (I)



zukommen kann. Da umgekehrt aus dem IR-Spektrum von (I), Abb. 3, und den Spektren aller übrigen aus substituierten Thiosemicarbaziden durch Diazotierung darstellbaren Verbindungen[7] hervorgeht, daß durchweg ein- und dasselbe Ringgerüst vorliegt, darf somit die Thiatriazolstruktur (I) als gesichert gelten.

Semicarbazid und salpetrige Säure

Über eine derartige Umsetzung wurde schon von Thiele u. Stange[9] bzw. Curtius u. Heidenreich[3] berichtet, die das überraschenderweise stabile, kristallisierte Carbaminsäureazid (VIII) isolieren konnten:

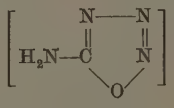


(VIII)

Die Azidstruktur (VIII) konnten wir an Hand des IR-Spektrums (Abb. 4) vollauf bestätigen.

Die für Azide charakteristische Frequenz fanden wir bei 2179 cm^{-1} (ω_a N=N=N). Darüberhinaus ist auch eine Totalzuordnung des gesamten IR-Spektrums möglich[7].

Somit muß festgestellt werden, daß aus Semicarbazid und salpetriger Säure nicht etwa das 5-Amino-oxatriazol (IX),



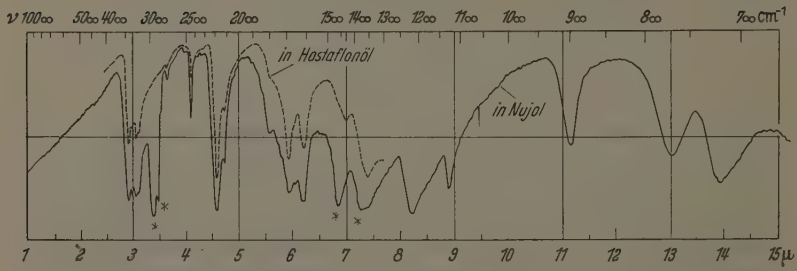


Abb. 4. IR-Spektrum des Carbaminsäure-azids, H_2N-CS-N_3 (Nujol- und Hostaflonöl-Suspension). 2179 cm^{-1} (ω_a N=N=N) beweist die Anwesenheit einer Azidgruppe

sondern das Carbaminsäureazid (VIII) entsteht, während man aus *Thio*semicarbaziden und salpetriger Säure umgekehrt nur Aminothiatriazole (I), nicht jedoch Thiocarbaminsäureazide (II) isolieren kann. Ähnliche Verhältnisse findet man auch bei den sogenannten intramolekularen Kupplungen, über die ZOLLINGER[10] zusammenfassend berichtet hat.

Experimenteller Teil

Aufnahme der Spektren

Die IR-Spektren im Bereich 10000—400 cm^{-1} (1—25 μ) wurden mit Hilfe der Doppelstrahl-Prismenspektrometer Modell 21 (NaCl-Prisma) und Modell 137 (KBr-Prisma) der Fa. Perkin-Elmer aufgenommen. Die durchweg kristallisierten Substanzen wurden sowohl in Nujol-, als auch in Hostaflonöl-Suspension aufgenommen. Nujol (Paraffinöl) allein hat den Nachteil, daß in den Bereichen 1380 bis 1450 cm^{-1} und 2700—3000 cm^{-1} die intensiven Linien der CH_2- und CH_3-Deformations- und Valenzschwingungen auftreten, so daß die entsprechenden CH-Frequenzen der zu untersuchenden Substanz im allgemeinen nicht beobachtet werden können. Untersucht man jedoch zwischen 5000 und 1350 cm^{-1} (etwa 2—7,5 μ) zusätzlich noch eine Hostaflonöl-Suspension, so beobachtet man hierbei mit Sicherheit nur die Absorptionsbanden der suspendierten Substanz, da Hostaflonöl infolge Abwesenheit jeglicher C-H-Bindungen erst unterhalb 1350 cm^{-1} absorbiert.

Die Kernresonanzspektren werden mit dem großen Varian-Spektrometer aufgenommen (vgl. G. ENGLERT[4]).

Darstellung und Reinigung der Substanzen

5-Amino-1,2,3,4-thiatriazol wurde im wesentlichen nach den Angaben von FREUND u. SCHANDER[6] aus Thiosemicarbazidhydrochlorid und der äquivalenten Menge Natriumnitrit aus wäßriger Lösung dargestellt. Sofern man mit Eiswasser gut kühlt, kräftig rührt und einen Überschuß von Nitrit vermeidet, erhält man Ausbeuten von 75—80% des Thiosemicarbazidhydrochlorid. FP 128° C; bei 130° C verpufft die Substanz. Ein Umkristallisieren (z. B. aus Methanol) ist nicht zu empfehlen, da bereits bei gelindem Erwärmen Schwefel abgespalten wird.

5-Methylamino-1,2,3,4-thiatriazol wird gleichfalls am besten nach FREUND u. Mitarb.[6] dargestellt. FP 96° C (aus Diäthyläther). Ausbeute 80% des Thiosemicarbazidhydrochlorid.

Carbaminsäureazid. In Abänderung der bisher erschienenen Vorschriften[3] wurde eine Lösung von 11,2 g (0,1 Mol) Semicarbazidhydrochlorid in 50 ml Wasser unter Kühlung und dauerndem Rühren oder Schütteln tropfenweise mit einer Lösung von 6,9 g (0,1 Mol) Natriumnitrit in 15 ml Wasser versetzt. Die wäßrige Lösung des Reaktionsprodukts wurde dann 3mal mit je 50 ml Äther extrahiert, die vereinigten Ätherlösungen mit Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Abziehen des Äthers hinterblieben weiße, derbe Kristalle. FP 97° C (aus CCl_4).

Zusammenfassung

An Hand von IR- und Kernresonanzspektren konnte bewiesen werden, daß das 1,2,3,4,-Thiatriazol-Ringgerüst in Form von 5-Aminoderivaten existiert. Dieser heterocyclische Fünfring entsteht jedoch nur dann, wenn man Thiosemicarbazid oder solche N-Alkyl- bzw. N-Arylthiosemicarbazide diazotiert, deren 1- *und* 2-Stellung nicht substituiert sind[7]. Ein Thiocarbaminsäureazid (II) läßt sich hierbei in Substanz nicht isolieren; dagegen erweist sich das aus Semicarbazid und salpetriger Säure darstellbare Carbaminsäureazid (VIII) als beständig, während umgekehrt ein 5-Amino-1,2,3,4-oxatriazol (IX) nicht bekannt ist.

Herrn Dr. G. ENGLERT, Institut für Elektrowerkstoffe der Fraunhofer-Gesellschaft, Freiburg i. Br., danken wir für die Durchführung der kernresonanzspektroskopischen Untersuchungen. — Darüber hinaus gilt unser Dank auch dem Verband der Chemischen Industrie — Fonds der Chemie —, der den einen von uns (M. K.) durch ein Stipendium unterstützt hat.

Literatur

[1] ADAMS, R.: Organic Reactions, Vol. III, (1946) S. 362. — [2] BATTEGAY, M., u. E. HÉGAZI: Helv. chim. Acta **16**, 999 (1933). — [3] CURTIUS, T., u. K. HEIDENREICH: J. prakt. Chem. **52**, 467 (1895). — [4] ENGLERT, G.: Vortrag bei dieser Tagung (diese Z. **181**, 447 (1961). — [5] ENGLERT, G., u. M. KUHN: noch unveröffentlichte Protonenresonanzuntersuchungen an Thiosemicarbaziden und Aminothiatriazolen. — [6] FREUND, M., u. A. SCHANDER: Ber. dtsch. chem. Ges. **29**, 2500 (1896). — FREUND, M., u. H. P. SCHWARZ: Ber. dtsch. chem. Ges. **29**, 2491 (1896). — FREUND, M., u. H. HEMPEL: Ber. dtsch. chem. Ges. **28**, 77 (1895). — [7] KUHN, M., u. R. MECKE: noch unveröffentlichte IR-spektroskopische und chemische Untersuchungen an Thiosemicarbaziden und Aminothiatriazolen. — [8] LIEBER, E., C. N. PILLAI u. R. D. HAITES: J. org. Chemistry **22**, 1054 (1957); Canad. J. Chem. **35**, 832 (1957); **37**, 101 (1959). — [9] THIELE, J., u. O. STANGE: Liebigs Ann. Chem. **283**, 37 (1894). — [10] ZOLLINGER, H.: Chemie der Azofarbstoffe, Basel und Stuttgart 1958, S. 49, 79ff.

Prof. Dr. R. MECKE, Institut für physikalische Chemie der Universität Freiburg i. Br., Hebelstraße 38

Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen und Chemisches Institut der Universität Tübingen (biochemische Arbeitsgruppe)

Über Kondensationsprodukte aromatischer Amine mit Hydroxyaldehyden

Von

SIEGMAR LÄUFER und FRANZ LINGENS

Mit 5 Textabbildungen

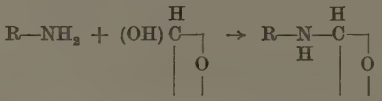
(Eingegangen am 28. Oktober 1960)

Die Kondensation von Carbonylverbindungen mit Partnern, die über Aminogruppen verfügen, ist ein Reaktionsschritt, der im Laufe der Biogenese einer Reihe von Naturstoffen — so z. B. auch der Nucleinsäuren — eine große Rolle spielt.

Eine nähere Kenntnis über den Chemismus dieser Reaktion und die Struktur der Produkte, die dabei entstehen können, scheint deshalb nicht ohne Bedeutung im Hinblick auf die Beurteilung möglicher Kondensationsvorgänge zu sein. Die Kenntnis von Absorptionsspektren der Reaktionsprodukte liefert nicht nur rascher Aufschluß über ihre Zusammensetzung als die chemische Analyse, sondern kann häufig sehr viel mehr als diese aussagen.

Die eingangs erwähnte Kondensation spielt auch eine Rolle bei der Biogenese des Tryptophans, mit der sich LINGENS[8] seit einiger Zeit befaßt hat. Dabei tauchte ganz allgemein die Frage nach der Struktur von Kondensationsprodukten aromatischer Amine mit Zuckern und ähnlichen Verbindungen auf, da ein Kondensationsprodukt von Anthranilsäure mit einem Hydroxyaldehyd als Zwischenprodukt vermutet wurde.

Es ist bekannt, daß Aldosen mit Aminen zu Glykosaminen kondensieren,

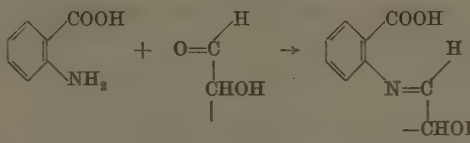


I

die unter gewissen Bedingungen durch Umlagerung weitere Veränderungen erleiden können.

Andererseits wird allgemein angenommen, daß Amine mit Carbonylverbindungen primär zu Schiffschen Basen reagieren. Auch wird berichtet, daß sowohl Derivate der Cyclo-, als auch der offenen Kettenform (Schiffsche Basen) bekannt seien[10].

Es war daher im Zuge der oben erwähnten Arbeit zunächst die Frage zu beantworten, ob die Kondensation von Anthranilsäure mit Zuckern zu Schiffschen Basen führt, etwa nach folgendem Schema



II

an das sich womöglich eine Amadori-Umlagerung anschließen könnte, oder ob sie ein acetalartiges Produkt (N-glykosid) liefert, entweder nach dem formalen Schema (I) in einer direkten Reaktion mit dem acetalisierten Zucker oder aber infolge Isomerierung der nach Schema (II) entstandenen Schiffschen Base.

Die UV-Spektren des Anthranilsäure-N-glykosids und auch einer Reihe anderer N-Glykoside (Abb. 1) lassen erkennen, daß bei dieser Reaktion keine Schiffschen Basen entstehen, denn die Spektren entsprechen in Lage und Intensität der Banden demjenigen der Anthranilsäure. Die Spektren der entsprechenden Schiffschen Basen dagegen müßten deutliche Unterschiede aufweisen.

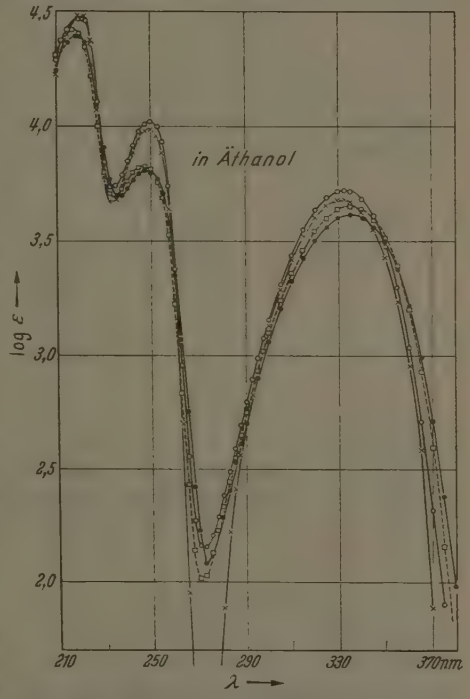


Abb. 1. UV-Spektren von Anthranilsäure: □---□ und ihren Kondensationsprodukten mit Glucose: ×—×; Ribose: ○ ○; und Glykolaldehyd: •—•

Die kristallisierten Kondensationsprodukte mit Anthranilsäure und Anthranilsäureester schließen ebenfalls das Vorliegen von Schiffschen Basen aus, da sie in ihren IR-Spektren alle ohne Ausnahme im 3 μ-Bereich neben der OH-Absorption eine intensive scharfe Bande bei 3,0—3,1 μ erkennen lassen, die einer NH-Valenzschwingungsbande zuzuordnen ist (Tab. 1).

Da im Spektrum außer der Carbonylvalenzschwingungsbande der Säure bzw. des Esters bei 6 μ keine weitere C = O-Valenzschwingung

Tabelle 1

Zucker	Amin	ν_{NH} im Kondensationsprodukt μ
Ribose	Anthranilsäure	3,01 [8]
L-Arabinose	Anthranilsäure	3,08 [9]
D-Arabinose	Anthranilsäure	2,99 [9]
2-Desoxy-d-glucose	Anthranilsäure	3,05 [9]
2,3,4,6,-Tetraacetylglucose	Anthranilsäuremethylester	3,01 [9]
D-Ribose	Anthranilsäuremethylester	3,05 [7]
D-Glucose	Anthranilsäuremethylester	3,05 [9]

erscheint, schrumpft der Fragenkomplex auf die Alternative Enamin oder Pyranose (bzw. Furanose) zusammen. Amadori-Produkte waren nicht entstanden (Teste mit 2,6-Dichlorphenolindophenol[3] und 2, 3, 5-Triphenyltetrazoliumchlorid[5] negativ).

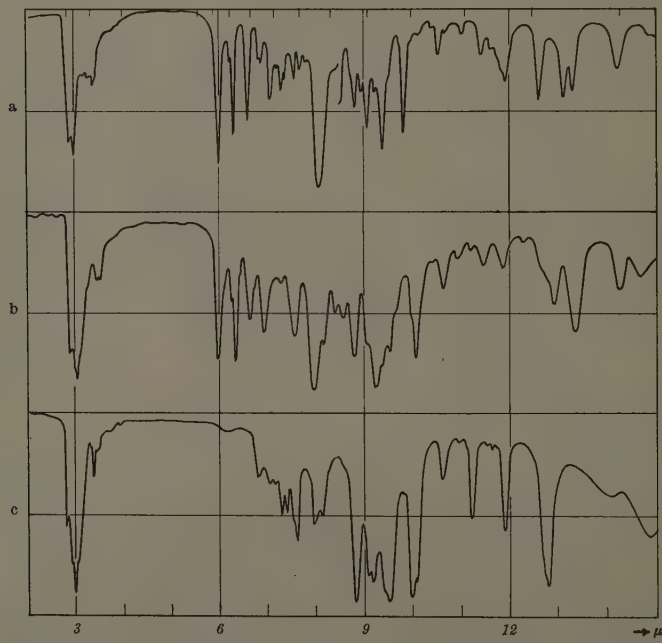


Abb. 2. IR-Spektren der Kondensationsprodukte von D-Arabinose mit Anthranilsäure (a) und mit Anthranilsäuremethylester (b); c von L-Arabinose (identisch mit D-Arabinose)

Immerhin sind in den IR-Spektren die NH-Valenzschwingungsbanden neben den OH-Banden nicht immer eindeutig als solche zu erkennen. Abb. 2 zeigt am Beispiel der Spektren der Arabinose und ihres N-Glykosids mit Anthranilsäure und mit Anthranilsäuremethylester sehr deutlich die große Ähnlichkeit aller Spektren im fraglichen Bereich. Vollkommen eindeutig ist dagegen das IR-Spektrum des Kondensationsproduktes mit 2,3,4,6-Tetraacetylglucose, dessen scharfe NH-Valenzschwingungsbande ungestört durch Hydroxylvalenzschwingungen erscheinen kann (Abb. 3).

Die Gegenüberstellung ihrer IR-Spektren erlaubt es nun, die endgültige Antwort auf die Frage nach der Struktur dieser Kondensationsprodukte zu geben.

Im Spektralgebiet von 10,5—13 μ haben nämlich die Zucker und ihre Glykoside eine ausgeprägte Bandenfolge, und zwar nur dann, wenn sie in der cyclischen Form vorliegen[2]. Die hier gezeigte D-Arabinose bzw.

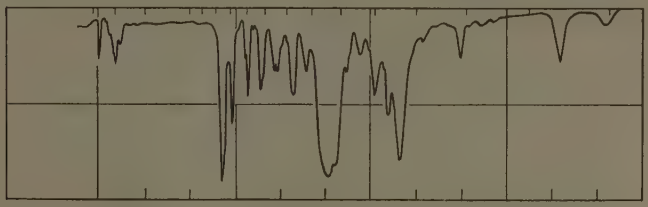


Abb. 3. IR-Spektrum des Kondensationsproduktes von Anthranilsäure mit 2,3,4,6-Tetraacetylglucose (Konzentration im 3 μ-Bereich dreimal so hoch wie im übrigen Teil des Spektrums)

L-Arabinose liegt in der β-Pyranose-Form vor. Die hierfür charakteristische Bandenfolge kehrt in ihrem N-Glykosid mit Anthranilsäure wieder, womit für das Kondensationsprodukt die gleiche Konfiguration bewiesen ist. Die IR-Spektren geben weiter darüber Aufschluß, daß auch die Kondensationsprodukte der Anthranilsäure (sowie ihres Methylesters) mit Glucose und Ribose in der N-glykosidischen Pyranoseform vorliegen.

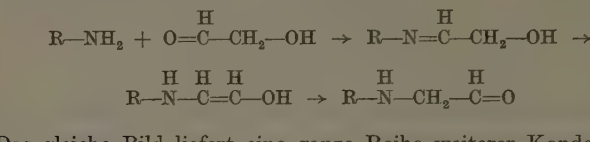
Es erhob sich nun die Frage, ob die Bildung acetalartiger Kondensationsprodukte auf die Zucker als Reaktionspartner beschränkt ist. Zu ihrer Beantwortung schienen uns zunächst die ohnehin aus der biologischen Problemstellung der zitierten Arbeit benötigten Kondensate mit Glykolaldehyd geeignet zu sein.

Da dieser nur 2 C-Atome in der Kette besitzt, sollte hier die Bildung einer acetalartigen, cyclischen Struktur nach Art der Zucker ausgeschlossen sein.

Sein Kondensationsprodukt mit Anthranilsäure beweist durch das UV-Spektrum (Abb. 1), daß auch hier keine Schiffsche Base entstanden

war; das IR-Spektrum entspricht denjenigen mit Zuckerkomponenten und zeigt eine intensive NH-Valenzschwingungsbande bei 3 μ.

Das IR-Spektrum des mit Glykolaldehyd kondensierten Anthranilesters zeigt bei 3 μ nur die NH-Valenzschwingungsbande und keine OH-Valenzschwingung. Im 6μ-Bereich erscheint außer der Estercarbonylvalenzschwingungsbande keine weitere Bande, die eine Carbonylgruppe anzeigt. Das heißt aber, es liegt weder eine Schiffsche Base, noch ein Enamin noch ein N-substituierter Aminoaldehyd vor, Verbindungen, die nach folgendem Schema entstanden sein könnten:



III

Das gleiche Bild liefert eine ganze Reihe weiterer Kondensationsprodukte des Glykolaldehyds mit anderen aromatischen Aminen (Tab. 2).

Tabelle 2. *Kondensationsprodukte aromatischer Amine mit Glykolaldehyd*[7]

Kondensationspartner	ν_{NH} μ	Kurzwelligste Bande im 6 μ-Bereich μ
Anilin	3,0	6,27
p-Toluidin	2,97	6,19
o-Toluidin	2,97	6,25
o-Aminobenzonitril	3,04	6,27
o-Nitranilin	3,01	6,23
o-Amino-acetophenon	3,10	6,15
Anthranilsäuremethylester	3,08	5,98

Es fragt sich nun, welche Konstitution diesen Produkten zukommt, nachdem alle eben formulierten Strukturen ausscheiden.

Auffällig in den IR-Spektren ist die Absorption zwischen 8,5 und 12 μ, wo eine Reihe intensiver Banden erscheint. Bei allen untersuchten Kondensationsprodukten treten intensive Banden bei 11 und 11,5 μ besonders auffallend hervor.

In diesem Bereich zeigen sowohl iso- als auch heterocyclische, methylengruppenhaltige Sechsringe 2 Bandengruppen, nämlich die eine zwischen 9 und 10 μ, die andere zwischen 10,5 und 12 μ. Die intensiven Banden kommen unter anderem den CH_2-rocking und den C-C-Ringvalenzschwingungen zu[4]. Danach können für die Ringstruktur als charakteristisch die Banden bei 891 und 854 cm^{-1} im Cyclohexanspektrum und entsprechend bei 870 und 886 cm^{-1} im 1,4-Dioxanspektrum betrachtet werden, besonders deshalb, weil dieses Spektralgebiet ansonsten verhältnismäßig transparent ist.

Nach der kryoskopischen Molekulargewichtsbestimmung existiert der Glykolaldehyd in frischer, wäßriger Lösung und demnach auch in fester Form in dimerem Zustand[6]. Das IR-Spektrum beweist dieses, denn auch der Glykolaldehyd zeigt in den charakteristischen 2 Bereichen intensive Banden, die nur mit der Annahme einer 2,5-Dihydroxy-1,4-dioxan-Struktur zu deuten sind; ähnlich wie bei den Zuckern sind im Bereich von 10,8—12 μ außerdem die CH-Deformationsschwingungen zu erwarten, die den äquatorialen bzw. axialen CH-Valenzen an den C-Atomen zukommen, die zwischen zwei O-Atomen stehen[2].

Abb. 4 gibt die Teilspektren dieser 3 Stoffe übereinander wieder. Dementsprechend zeigt der feste Glykolaldehyd keine Carbonylvalenzschwingungsbande.

Ein ganz ähnliches Absorptionsbild bieten nun die Kondensationsprodukte aromatischer Amine mit Glykolaldehyd. Da die Ringvalenzschwingungen durch Substituenten an einem Ringatom keine starken Frequenzänderungen erfahren dürften, wird man die meist in der Nähe von 11,5 μ auftretende intensivere Bande einer C-C-Ringschwingung entsprechend derjenigen des Dioxans bzw. Glykolaldehyds zuordnen dürfen (Abb. 5).

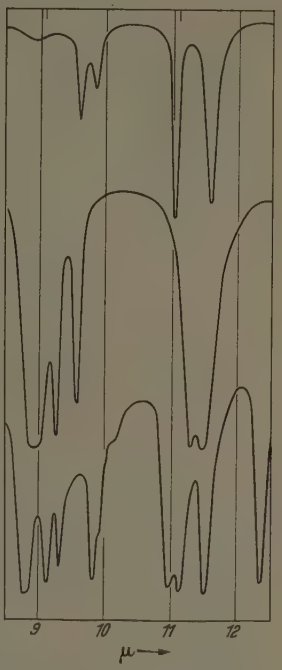
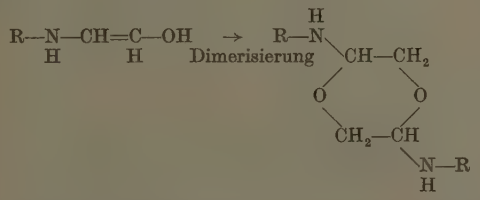


Abb. 4. IR-Spektren von Cyclohexan, 1,4-Dioxan und Glykolaldehyd (letzterer fest in KBr) (Reihenfolge von oben nach unten)

Diese Produkte wären damit als N,N-substituierte 2,5-Diamino-1,4-dioxane aufzufassen, entsprechend der Dimerisierung eines entweder nach dem oben skizzierten Schema entstandenen Enols,



IV

oder aber entstanden durch direkte Kondensation des dimeren Glykolaldehyds mit den Aminen.

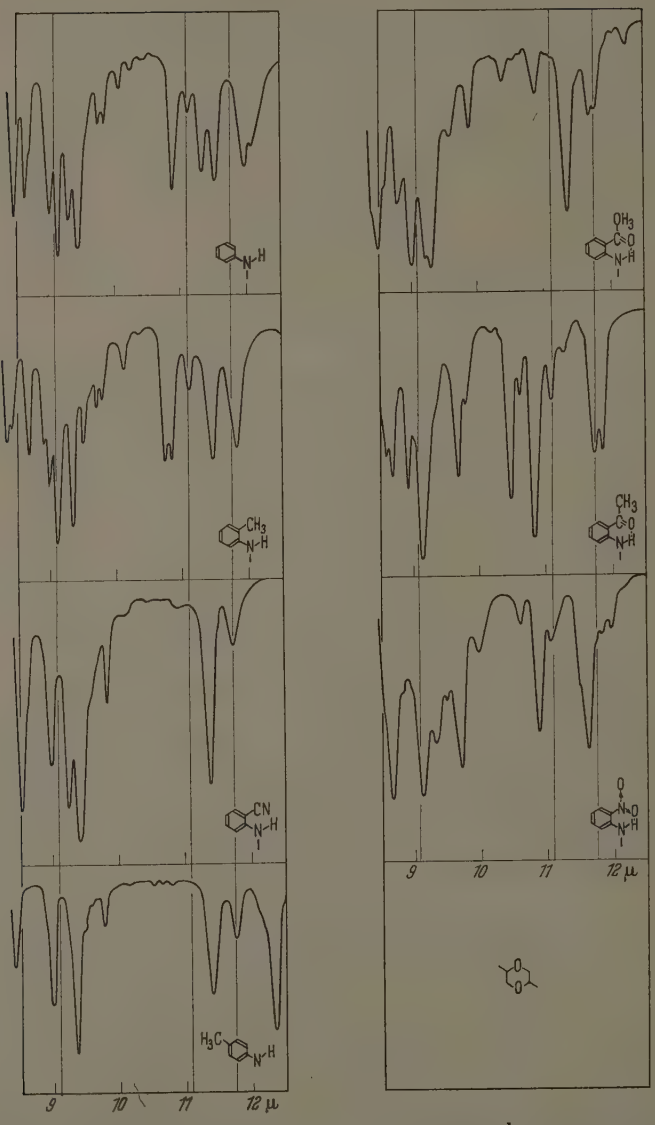
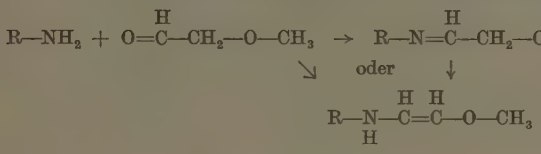


Abb. 5 a und b. IR-Spektren von Kondensationsprodukten aromatischer Amine mit Glykolaldehyd

Die daraufhin angestellte Molgewichtsbestimmung* ergab auch tatsächlich Werte, die sehr gut mit der Annahme des doppelten, nicht aber des einfachen Formelgewichts, in Einklang standen.

Sicher ist, daß die Vorstufe einer Dimerisierung nicht ein Aminoaldehyd — etwa entstanden nach dem Formelschema III — sein kann, da dieser — entsprechend dem Dimerisierungsschema des Glykolaldehyds 2,5-Dihydroxy-1,4-diazane und keine 1,4-Dioxane liefern müßte.

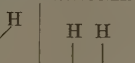
Es taucht die Frage auf, ob die Enaminstufe hier an sich beständig ist oder ob sie sich nur als Übergangszustand vor der Dimerisierung bilden kann. Zur Klärung dieser Frage ist der Methoxyacetaldehyd geeignet. Da seine Kondensationsprodukte kein zweites bewegliches Wasserstoffatom besitzen, ist formal nur die Imin- oder die Enamin-Form möglich:



V

Alle Kondensationsprodukte verschiedener aromatischer Amine mit Methoxyacetaldehyd besitzen eine NH-Gruppe, wie in den Infrarotspektren an der scharfen NH-Valenzschwingungsbande bei 3 μ (vgl. Tab. 3) zu erkennen ist. Da sie monomolekular sind**, können sie nur Enamine darstellen. Wie außerdem aus den IR-Spektren hervorgeht, bevorzugen sie die „trans"-ständige Anordnung der Doppelbindung.

Tabelle 3. *Kondensationsprodukte aromatischer Amine mit Methoxyacetaldehyd*

Kondensationsprodukte	ν_{NH} μ	μ	 μ
β-[N-Phenylamino]-vinyläther	3,04	10,1	
β-[N-o-Nitrilophenylamino]-vinyläther	3,02 3,07	10,3	
β-[N-o-Nitrophenylamino]-vinyläther	3,03	10,2 (10,3)	14,35
β-[N-o-Carbomethoxyphenylamino]-vinyläther	3,045	10,3	14,25
β-[N-o-Carboxyphenylamino]-vinyläther	3,05		

Das heißt aber, Schiffsche Basen lassen sich mit Methoxyacetaldehyd gar nicht darstellen und — wohl mit allen Aldehyden nicht, die in β-Stellung eine geeignete Struktur besitzen. Wahrscheinlich genügt dazu schon ein Heteroatom mit einem freien Elektronenpaar.

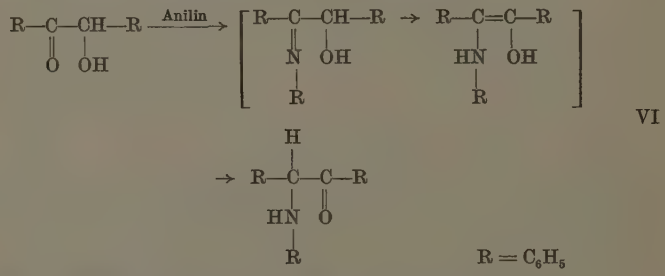
* Nach Rast; in Benzol ist die Löslichkeit dieser Substanzen zu gering.

** Molgewichtsbestimmung kryoskopisch, in Benzol.

Als bemerkenswert scheint sich aus dieser Untersuchung die Erkenntnis herauszuschälen, daß Aldehyde mit Aminen durchaus nicht ohne weiteres Schiffsche Basen liefern. Vielmehr scheint es so, als ob das nur unter ganz bestimmten Voraussetzungen möglich ist, wie z.B. bei der Bildung von Benzalanilin, wo gar keine prototrope Umwandlung eintreten kann. Anders verhalten sich Hydroxyaldehyde und Methoxyacetaldehyd. Die eventuell primär entstehende Schiffsche Base lagert sich hier in das Enamin um, das im Falle des Methoxyacetaldehyds die Endstufe der Reaktion darstellt.

Dieser Reaktionsverlauf ist nicht ganz überraschend. Es existiert nämlich eine Parallele in der bereits im Jahre 1886 entdeckten Voigt-Umlagerung[11].

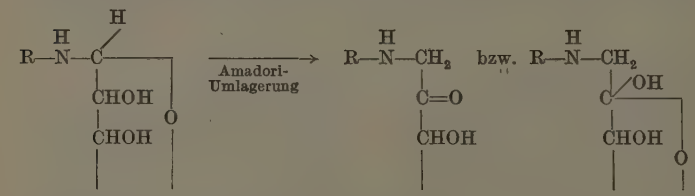
Benzoin reagiert nämlich mit Anilin in folgender Weise



VI

zu einem α-Aminoketon und nicht zum α-Hydroxyimin.

Hier entzog sich die Enaminstufe bisher unserer Beobachtung, da sie sich — wohl spontan — in die Carbonylstufe umlagert. Ein weiter verbreiteter Spezialfall der Voigt-Umlagerung (nämlich prototropierter Schiffscher Basen) ist die Amadori-Umlagerung der Zucker-Derivate[1]



VII

die nach WEYGAND[12] über die Zwischenstufe eines Immoniumkations (Kation der Schiffschen Base) verläuft.

Nach den hier berichteten Erfahrungen scheint die Schiffsche Base das energiereichste aller formal möglichen Kondensationsprodukte bei den betrachteten Verbindungstypen zu sein. Schiffsche Basen werden deshalb nur dann erhalten werden können (Spezialfall!), wenn sie keine Möglichkeit besitzen sich durch Prototropie weiter zu verändern.

Wir danken dem Fond der chemischen Industrie und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für Unterstützung dieser Arbeit, den Farbenfabriken Bayer für Überlassung von Chemikalien. Herrn W. ROY danken wir für die Aufnahme der Spektren*.

Literatur

[1] AMADORI, M.: Atti Reale Accad. naz. Linei, Rend. (6) **2**, 337 (1925); **13**, 72, 195 (1931). — [2] BARKER, S. A., E. J. BOURNE, R. STEPHENS u. D. H. WHIFFEN: J. chem. Soc. (London) **1954**, 3468. — [3] BRAY, H. J., W. V. THORPE u. K. WHITE: Biochemic. J. **46**, 271 (1950). — [4] BURKET, ST. C., u. R. M. BADGER: J. Amer. chem. Soc. **72**, 4397 (1950). — [5] JOHANSON, R.: Nature (London) **172**, 956 (1953). — [6] KARRER, P.: Lehrbuch der organischen Chemie, Georg Thieme, Leipzig (1943), 9. Aufl. S. 271. — [7] LINGENS, F.: unveröffentlicht. — [8] LINGENS, F., H. J. BURKHARDT, H. HELLMANN u. F. KAUDEWIK: Z. Naturforsch. **12b**, 493 (1957). — [9] LINGENS, F., u. H. HELLMANN: Liebigs Ann. Chem. **630**, 87 (1960). — [10] MICHEEL, F.: Chemie der Zucker und Polysaccharide, Akad. Verlagsges. Geest u. Portig K.-G. Leipzig (1956); 2. Aufl., S. 68, 120. — [11] VOIGT, K.: J. prakt. Chem. (2) **34**, 2 (1886). — [12] WEYGAND, F.: Ber. dtsch. chem. Ges. **73**, 1259 (1940).

Dr. SIEGMAR LÄUFER, Degussa, Werk Rheinfelden/Baden, Schließfach 68
(früher: BFA für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen)

Agrikulturchemisches und bodenkundliches Institut der Universität Göttingen

Gewinnung, Auftrennung und Charakterisierung von Huminsäuren

Von
W. ZIECHMANN

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 27. Oktober 1960)

Es gilt heute als sicher, daß die Bildung von Huminstoffen im sogenannten Humifizierungsprozeß einen Teil des Inkohlungsvorganges darstellt. Es ist auch weiterhin bekannt, daß gerade diese Phase der Inkohlung die am wenigsten erschlossene ist[17]. Möglicherweise hängt das damit zusammen, daß in diesem Abschnitt der Übergang von niedermolekularen zu höher- bzw. hochmolekularen Systemen erfolgt und man sich lange nicht einig war, nach welchen Gesichtspunkten ihre Untersuchung erfolgen sollte, wie man eine umfassende Nomenklatur aufbauen sollte, ja oft auch, welches die Ziele einer experimentellen Durchdringung dieses komplexen Gegenstandes sein sollten**.

* IR-Spektren, fest in KBr (Cyclohexan und Dioxan flüssig), aufgenommen mit dem selbstregistrierenden IR-Spektrographen der Firma E. Leitz, Wetzlar.

** Paradoxerweise scheint das Bedürfnis nach „Schnellmethoden" um so dringender immer dann zu sein, je komplizierter ein Sachgebiet zu durchdringen ist.

Huminstoffe stellen ein Gemisch ähnlich aufgebauter, organischer, höher- bzw. hochmolekularer Verbindungen dar, die als typische bodeneigene Stoffe des Humifizierungs- bzw. Inkohlungsprozesses in charakteristischer Anhäufung zu beobachten sind.

Aus dieser komplexen Gruppe von Naturstoffen lassen sich trotzdem 3 Untergruppen herausschälen, deren Abtrennung sowohl experimentell möglich, als auch theoretisch sinnvoll erscheint. Es sind dies die

Huminsäure-Vorstufen,
Huminsäuren,
Humine.

Huminsäure-Vorstufen sind solche Anteile, die mit kleinem Teilchengewicht noch überaus reaktionsfähig sind und unter den üblichen Bedingungen zu den *Huminsäuren* unter Verlust reaktiver Gruppen und Vergrößerung des Teilchengewichtes aufoxydiert werden. Den *Huminen* kommt, im Gegensatz zu den beiden anderen Anteilen, kein saurer Charakter mehr zu, sie greifen schon weit in Inkohlungsvorgänge ein und sind für unsere Betrachtungen ohne Belang.

Zur Unterscheidung der Huminsäure-Vorstufen und der Huminsäuren seien in aller Kürze einige Möglichkeiten aufgeführt (Tab. 1)[19].

Tabelle 1. *Zur experimentellen Unterscheidung von Huminsäuren und ihren Vorstufen*

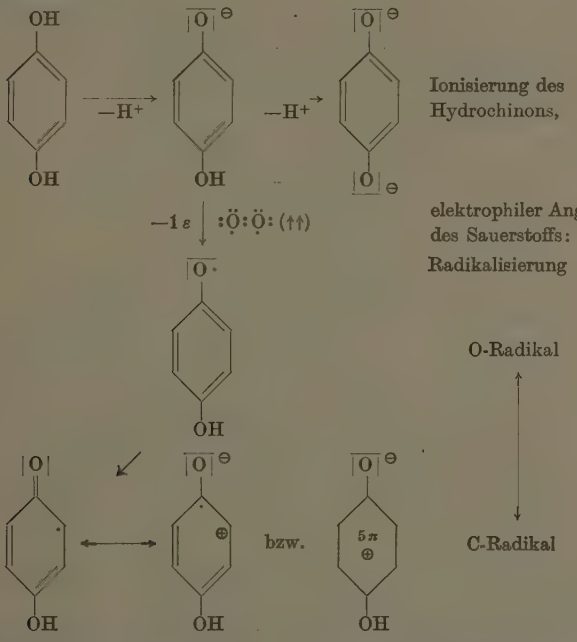
	Vorstufen	Huminsäuren
Teilchengewicht (T_g)	$T_{g\,(\text{Vorstufen})}$	$< T_{g\,(\text{Huminsäuren})}$
Wanderung im elektr. Feld (Elektrophorese)	maximal	keine
Lichtabsorption UV-Bereich	Maxima vorhanden oder angedeutet	monotones Spektrum, keine Maxima
IR-Bereich	scharfe Banden	wenig und aufgeweitete Banden, starke Untergrundabsorption
Fluorescenz	mitunter	keine
reaktives Verhalten gegenüber O_2 in wäßrigen Lösungen oder Suspension über SiO_2	O_2-Aufnahme, Vergrößerung des Teilchengewichtes → Huminsäuren	keine Reaktion
reaktives Verhalten gegenüber stickstoffhaltigen Stoffen (milde Bedingungen)	Einbau von Stickstoff, $-NH_2-$, > NH-Gruppen	keine Reaktion
allgemeines Verhalten innerhalb des Humifizierungsprozesses	Aufbau-, gegebenenfalls Umbaureaktionen	Abbaureaktion
biochemisches Verhalten	teilweiser Wuchsstoffcharakter	keine nennenswerte Wirkung

Entsprechend dieser allgemeinen Charakteristik werden die Huminsäure-Vorstufen vornehmlich einen chemischen, die Huminsäuren einen physikalischen Einfluß auf ihre Umwelt ausüben. Ihre Stellung innerhalb der Humifizierungs- bzw. Inkohlungsvorgänge gibt das nachfolgende Schema wieder (Abb. 1, siehe S. 507).

Strukturchemische Stellung der Huminsäuren

Um die besonderen Schwierigkeiten herauszuarbeiten, die sich einer analytischen Bearbeitung dieser Stoffgruppe entgegenstellen, sei ein Wort über die strukturchemische Stellung der Huminsäure-Vorstufen und Huminsäuren gesagt.

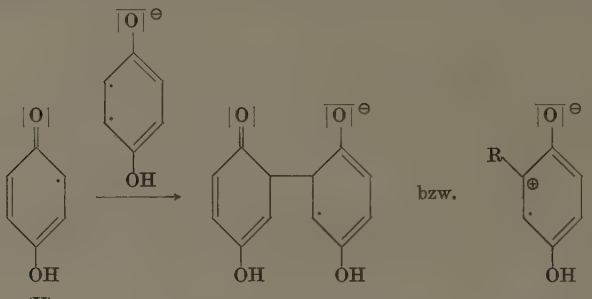
Die Huminsäurebildung in ihrer ersten Phase, also die Bildung von Zwischenstufen bzw. Huminsäure-Vorstufen, stellt eine Radikalisierung aromatischer Systeme dar, die durch einen elektrophilen Vorgang eingeleitet wird. Für Hydrochinon, das gebräuchliche Ausgangsmaterial für Modellversuche, stellen sich diese Vorgänge folgendermaßen dar[5,13]:



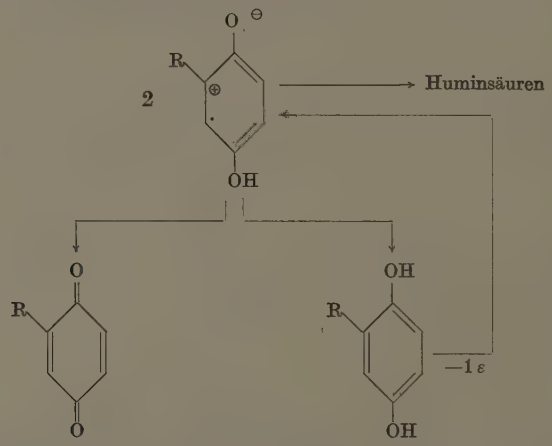
Der Radikalcharakter dieser Zwischenstufen konnte erwiesen werden, durch die Untersuchung der Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes, den Einfluß von UV-Licht auf die Reaktionsgeschwindigkeit, die Hemmung der Bildungsreaktion nach Zugabe von Styrol bzw. ·NO (Nachweis von O- und C-Radikalen im IR-Spektrum)[18].

Darüberhinaus sind im Experiment noch folgende Reaktionen, vom Semichinonradikal (VII) ausgehend verifiziert[5,18,19]:

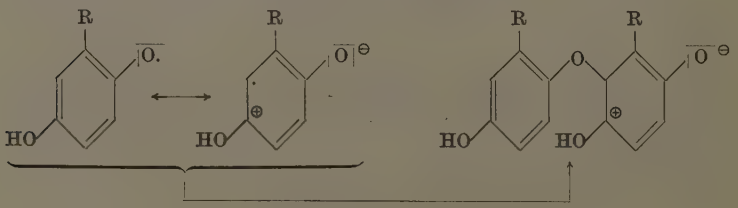
Radikalpolymerisation, die schließlich zu n-kernigen Radikalen führt, wobei mit steigendem n eine asymptotisch sich 0 nähernde Reaktionsgeschwindigkeit beobachtet wurde:



Eine Disproportionierung eines Semichinonradikals unter Rückbildung der Hydroxystruktur und Neubildung eines Chinons:



Weiterhin bei Reaktion von C- und O-Radikalen die Bildung von Ätherbrücken, eine besonders wichtige Verknüpfungsart bei Huminsäuren:



Schließlich können erfolgen

Dimerisierung, Telomerisation und Radikaltransfer.

Radikalreaktionen sind bei Modellsubstanzen, hier Polyoxyphenole nicht verwunderlich, sie konnten aber auch — und das ist recht bemerkenswert — bei natürlichen Substraten nachgewiesen werden[8,20]. Damit bestimmen derartige Reaktionstypen die Anfangsphase der Bildung natürlicher Huminstoffe und schon von diesem Reaktionsgeschehen her wird die Sonderstellung dieser Gruppe von Naturstoffen deutlich.

Zwei besondere Schwierigkeiten treten nun noch hinzu.

Neben die, in einer gewissen Phase bestimmenden und dominierenden Radikalreaktionen, treten auch solche rein ionischen Charakters, wie z. B. die Kondensation carbonyl-funktioneller Spaltstücke mit phenolischen Strukturelementen, die

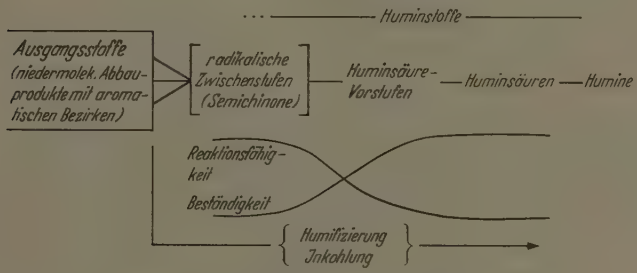


Abb. 1. Die Stellung von Huminsäure-Vorstufen, Huminsäuren und Huminen im Humifizierungsprozeß (schematisch)

direkte Carboxylierung aromatischer Kerne, besonders von mehrwertigen Phenolen oder die hydrolytische Kernspaltung geeignet substituierter Phenolderivate, um nur einige zu nennen.

Schließlich führen daneben reine Polykondensationen durch Vergrößerung des Teilchengewichtes in den Bereich der höher- oder gar makromolekularen Stoffe.

Zusammenfassend läßt sich über eine struktursystematische Einordnung der Huminsäuren und auch der Huminsäure-Vorstufen sagen, daß es sich mindestens um höhermolekulare Stoffe handelt, — bei den Huminsäuren ganz sicher — die aus einer kaum angebbaren Anzahl von Bausteinen bestehen, die durch keine einheitliche Bindungsform miteinander verknüpft sind. Fassen wir sie als eine Gruppe von Stoffen auf, die aus heterogenen Bausteinen in heterogener Bindung aufgebaut sind. Zur Kontrastierung ließen sich ergänzend die Angaben der Tab. 2 anführen.

Hieraus ergeben sich wichtige Konsequenzen für die analytische Bearbeitung dieser Stoffe. Da eine quantitative Gewinnung unveränderter Bausteine durch hydrolytischen Abbau nicht möglich ist, kann auch eine Lösung des Sequenzproblems nicht in Angriff genommen werden. Zudem ist ja auch die Anordnung der Bausteine mehr oder weniger zufällig, so daß dieser an sich klare Begriff hier seine Umrisse verliert. Eine Konstitutionsermittlung ist hier gegenstandslos, gelänge sie, wäre damit nur eine Aussage über einen zeitlich und räumlich beschränkten Einzelfall gewonnen, keinesfalls aber eine Verallgemeinerung möglich.

Welches aber können nun angesichts dieser besonderen Problemlage die Ziele analytischen Arbeitens bei diesen wichtigen Naturstoffen sein?

Tabelle 2. *Die strukturtsystematische Stellung der Huminstoffe*

	Kunststoffe	Naturstoffe
homogene Bausteine in homogener Bindung	Perlon PAN, PVC Polyäthylen Polystyrol usw.	fast alle Kohlenhydrate und deren Derivate (Pektine, Chitin usw.)
heterogene Bausteine in homogener Bindung	Mischpolymerisate Buna S Polyurethane	fast alle Peptide und Eiweißstoffe
heterogene Bausteine in heterogener Bindung	Synthetische Huminsäuren	natürliche Huminsäuren

Wir wissen, daß das Fortschreiten des Humifizierungsprozesses sich manifestiert in einem Verlust reaktiver Gruppen und einer Vergrößerung des Teilchengewichtes. Hier ist also die Möglichkeit gegeben, eindeutig zu entscheiden, welche Position ein Substrat innerhalb dieses Naturvorganges einnimmt; die Frage also nach der noch verbliebenen Reaktionsfähigkeit bzw. nach der Zugehörigkeit zur Gruppe der Huminsäuren oder deren Vorstufen; für bestimmte Probleme eine überaus wichtige Entscheidung. Eng damit verknüpft ist das Problem der Einheitlichkeit, also der Streubereich der Teilchengewichte, denn eine strenge Einheitlichkeit wird hier nicht zu erwarten sein.

In gewissen Einzelfällen wird eine exakte Aufklärung gewisser Bezirke des Huminsäureteilchens zur Beantwortung genetischer Fragen von Wichtigkeit sein.

Gewinnung natürlicher Huminsäuren

Gewöhnlich erfolgt ihre Gewinnung durch Lösen mit mehr oder weniger alkalisch reagierenden Solventien mit anschließender Säurefällung. Modellversuche haben jedoch mit aller Deutlichkeit gezeigt, daß gerade unter diesen Bedingungen, (die Anwesenheit von Luftsauerstoff ist gewöhnlich in den seltensten Fällen ausgeschlossen) eine Weiterreaktion der reaktiven Huminsäure-Vorstufen im Sinne des Humifizierungsprozesses erfolgt, sie werden also während des Extraktionsvorganges zu Huminsäuren aufoxydiert[3]. Eine so geführte Extraktion hat dann zur Folge, daß

1. Die Huminsäure-Vorstufen übersehen werden, und
2. die Ausbeute der Huminsäuren verfälscht wird[21].

Damit muß aber eine völlig falsche Beurteilung der „in vivo" gegebenen Verhältnisse einhergehen.

Wenn auch eine alkalische Extraktion schnell zu einem Ergebnis führt, wird man doch angesichts dieser Bedenken, eine zeitraubende und mühevolle Extraktion mit organischen Lösungsmitteln versuchen müssen.

Ein vornehmlich aus Eichenmoder bestehendes Huminsäurepräparat wurde mit organischen Lösungsmitteln extrahiert[3] (Tab. 3).

Tabelle 3. *Auftrennung eines natürlichen Huminstoffpräparates*

Lösungsmittel		Sedimentationskonstante $s \cdot 10^{-13}$ sec	prozentualer Anteil %
Alkohol	Fraktion 1	0,75 ± 0,01 (Flotation)	20%
Aceton	Fraktion 2	0,58 ± 0,01	17%
Dioxan	Fraktion 3	1,11 ± 0,09	34%
Dimethylformamid	Fraktion 4	1,15 ± 0,08	19%
Pyridin	Fraktion 5	1,20 ± 0,05	10%

Aus diesen Daten läßt sich eine für dieses Substrat charakteristische Verteilungskurve gewinnen. Hieraus ist ersichtlich, daß die Gruppe der Huminsäurevorstufen noch recht ansehnlich vertreten ist, daß also ein äußerst reaktionsfähiges Material vorliegt, welches sich am Beginn des Humifizierungsprozesses befindet (Abb. 2).

Diese Annahme kann durch einen Modellversuch bewiesen werden, durch eine Veränderung der isolierten Fraktionen über Kieselsäure mit Luftsauerstoff (vgl. Tab. 1). Nun ist die Verteilung eine vollkommen andere (gestrichelte Kurve, Abb. 2): die Gruppe der Huminsäure-Vorstufen ist fast vollständig zugunsten der der Huminsäuren verschwunden.

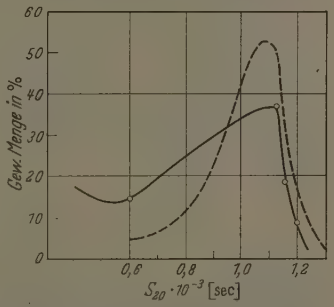


Abb. 2. Schematische Darstellung der Auftrennung eines natürlichen Huminstoffpräparates

Ein gleicher Befund ist in Gegenwart von OH-Ionen zu erwarten, womit aber gezeigt wird, daß bei einer Extraktion unter diesen Bedingungen in der Tat die Huminsäure-Vorstufen übersehen werden müssen.

Auftrennung

Die Anwendung verschiedener Lösungsmittel führt gewöhnlich, wie eben gezeigt, schon zu einer gewissen Vorfraktionierung, die im Einzelfall papierelektrophoretisch bzw. papierchromatographisch überprüft werden kann. In der Regel wird die Fixierung einer typischen Verteilungskurve jedoch nur mit anderen Mitteln zu erreichen sein.

Drei Verfahren haben sich hier besonders bewährt:
Die Trennung im elektrischen Feld als Säulenelektrophorese[6,12],
die Trennung im Schwerefeld der Ultrazentrifuge (bei etwa 180000 g)[10,11], und
die adsorptionschromatographische Trennung an Aluminiumoxid wechselnder Aktivität[16].

Die Leistungsfähigkeit dieser Methoden, oft auch kombiniert angewandt, sei an einigen Beispielen demonstriert.

Die elektrophoretische Auftrennung einer stickstoffhaltigen Hydrochinon-Huminsäure ergab 2 Fraktionen.

Die Bestimmung der Sedimentationskonstanten ergab nur für die obere Fraktion einen vertretbaren Wert. Der Verlauf der Sedimentation der unteren Fraktion hingegen erwies deutlich, daß dieser Anteil noch uneinheitlich war.

Eine Auftrennung im präparativen Rotor bei 180000 g ließ nach mehreren Stunden eine am Boden befindliche Fraktion ohne Schwierigkeiten gewinnen, während die Isolierung dreier anderer mehr oder weniger willkürlich erfolgen mußte.

Immerhin konnte für den obersten Anteil keine Sedimentationskonstante ermittelt werden, für die anderen beiden jedoch solche mit beträchtlicher Abweichung[11] (Abb. 3).

Die Auftrennung einer stickstofffreien Hydrochinon-Huminsäure unter Verwendung verschiedener Aluminiumoxidpräparate ergab 7 Fraktionen, die sich hinsichtlich ihrer Spektren (Abb. 4) kaum unterscheiden, jedoch deutliche Abweichungen ihrer Sedimentationskonstanten ergaben[14,16] (Tab. 4).

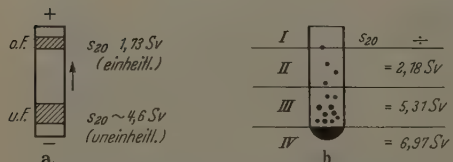


Abb. 3. Schematische Darstellung der Auftrennung einer Synthesehuminsäure im elektrischen Feld (a) und im Schwerefeld der Ultrazentrifuge (b)

Tabelle 4. *Sedimentationskonstanten eines an einer Aluminiumoxidsäule aufgetrennten Huminsäuregemisches*

$s_{20} = 1{,}13 \cdot 10^{-13}$ [sec]
$s_{20} = 0{,}45 \cdot 10^{-13}$ [sec] (b_1A)
$s_{20} = 1{,}63 \cdot 10^{-13}$ [sec]
$s_{20} = 1{,}12 \cdot 10^{-13}$ [sec] (n_3A)
$s_{20} = 0{,}759 \cdot 10^{-13}$ [sec] (n_2A)
$s_{20} = 1{,}69 \cdot 10^{-13}$ [sec] (n_1A)
$s_{20} = 1{,}397 \cdot 10^{-13}$ [sec]*

* s_{20} = Flotationskonstante.

Wenn einerseits zur Beurteilung bodenphysikalischer, bodenchemischer, mikrobiologischer, kolloidchemischer Fragen stets der Gesamtkomplex, also das hier und jetzt vorliegende uneinheitliche Substrat berücksichtigt werden muß, kann andererseits eine exakte Charakterisierung oder die Gewinnung allgemeiner, verbindlicher Gesichtspunkte nur vom möglichst sauber getrennten Präparat ausgehen.

Charakterisierung von Huminsäuren

Die Bedeutung der Lichtabsorption ist bereits gestreift worden. Zusammenfassend sei gesagt, daß der Bereich des sichtbaren und ultravioletten Lichtes zur Kennzeichnung der Huminsäuren überaus unergiebig ist[22]. Huminsäure-Vorstufen sind hier dagegen, je nach Differenzierung des Spektrums deutlich in ihrem relativen Humifizierungsgrad zu kennzeichnen (Abb. 5).

Nicht viel anders ist es im anschließenden Bereich des nahen IR-Gebietes von 0,7—2,5 μ. Hier interessieren vornehmlich die Obertöne

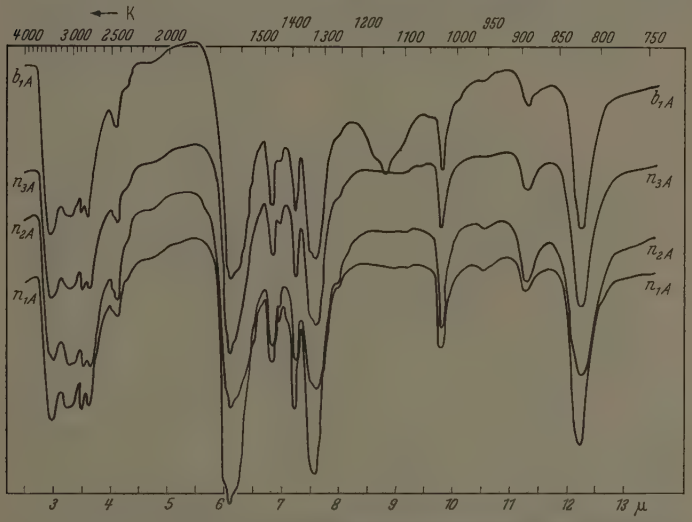


Abb. 4. Die IR-Spektren einzelner Fraktionen eines Huminsäuregemisches, das an der Aluminiumoxidsäule aufgetrennt wurde

der X-H-Valenzschwingungen, sowie bei 1,8—2,5 μ noch Kombinationsschwingungen der C=O, -CH- und OH-Gruppen. Besonders aufschlußreich ist das Gebiet zur Klärung der überaus wichtigen Frage, inwieweit es zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken kommt. Erst im infraroten Bereich des NaCl-Prismas (2—14 μ) lassen sich Strukturelemente bei Huminsäuren ausfindig machen (vgl. Abb. 5), die jedoch gelegentlich, bei uneinheitlichen Präparaten, infolge der hohen Grundabsorption nicht beobachtet werden können. Eine umfassendere Charakterisierung läßt sich gewinnen, wenn hierzu noch die Kenntnis des Teilchengewichtes bzw. einer abgeleiteten Größe tritt. Gewöhnlich genügt für relative Aussagen die in der Ultrazentrifuge gewonnene normierte Sedimentationskonstante, da alle klassischen Verfahren der Teilchengewichtsbestimmung hier versagen[15].

Eine Berechnung der Teilchengewichte nach der Svedberg-Formel führt zu keinen gesicherten und verwertbaren Ergebnissen, da sich der Diffusionskoeffizient nur recht ungenau angeben läßt. Im übrigen genügt die normierte Sedimentationskonstante vollauf.

Um die Ziele der analytischen Bemühungen und ihre besonderen Schwierigkeiten bei diesen Naturstoffen noch einmal besonders herauszuheben, seien abschließend einige Ergebnisse mitgeteilt, die sich aus Abbauversuchen natürlicher und künstlicher Präparate ergaben[1,7].

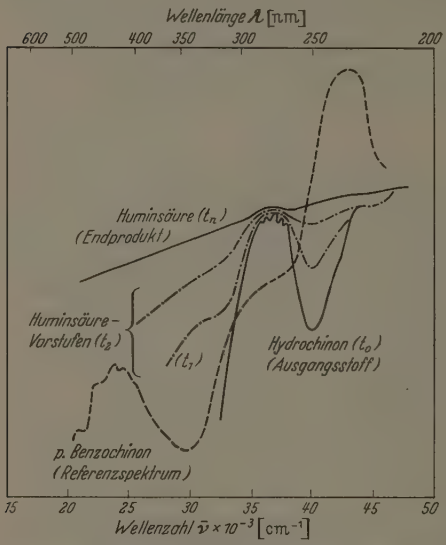


Abb. 5. Die Bildung einer Synthesehuminsäure aus Hydrochinon in Gegenwart von Kieselsäure

Eine auf üblichem Wege (also in Gegenwart alkalisch reagierender Lösungsmittel) gewonnene Huminsäure aus Niederungsmoortorf wurde zunächst einer totalen Protolyse (2 n Salzsäure) unterworfen. Es zeigte sich, daß ein überaus hoher Anteil, nämlich 42% im Hydrolysat wiedergefunden werden konnte. Dieser Anteil bestand zu 94% aus Kohlenhydraten, also einem Substrat, welches bestenfalls als Ausgangsmaterial für Humifizierungsvorgänge in Betracht kommt. Die Kohlenhydratkomponente besteht, wie weitere Untersuchungen ergaben, praktisch aus reiner Glucose. Wie sich weiterhin herausstellte, hat diese Komponente keineswegs die Funktion einer Brücke zwischen aromatischen Bausteinen, sondern stellt eine Randzone um einen mehr oder weniger humifizierten Kern dar. Möglicherweise lag die D-Glucose in Form von Cellulose oder ähnlichen Verbindungen vor. Erstaunlich ist hier die relativ leichte Hydrolysierbarkeit mit 2 n Salzsäure. Es muß daher angenommen werden, daß bei den Glucoseresten die primäre Hydroxylgruppe bereits oxydiert ist. Die Isolierung von Furfurol trotz Fehlen von Pentosen rechtfertigt diesen Schluß[2]. Ein mit der „entzuckerten" Huminsäure durchgeführter nitrierender Abbau ergab einen nicht mehr veränderlichen Anteil von 69%, sodann gelbgefärbte aromatische Nitroverbindungen (12%), sowie CO_2, Essigsäure, Propionsäure und Oxalsäure.

Obgleich eine weitere Darstellung dieser Abbauversuche hier nicht erfolgen kann, ergeben sich doch schon hieraus wichtige Befunde für die Struktur der Huminsäuren.

Wir erfassen einen überaus stabilen Kern, der hinsichtlich der Humifizierung bzw. Inkohlung schon relativ weit fortgeschritten ist. Die Kernperipherie, also die Teile, die unmittelbar um den Kern gelagert sind und als niedermolekulare Nitroaromaten anfallen, sind in geringerem Maße humifiziert. Von der Kohlenhydratkomponente der Randzone gilt dies in extremer Weise, sie sind praktisch noch im Stadium der Ausgangsstoffe, also eigentlich noch nicht Huminstoffe (vgl. Abb. 1). Trotzdem stellt ein solches Teilchen mit Bezirken unterschiedlichen Humifizierungsgrades, eine Einheit dar und verhält sich in chemischer und physikalischer Hinsicht auch so. Wir haben also Grund, neben der vorhin dargestellten äußeren eine innere, intramolekulare, im Molekül von innen nach außen fortschreitende Humifizierung zu postulieren. Damit aber ist ein neues Problem aufgeworfen, welches sich mit chemischen und physikalischen Methoden sehr wohl bearbeiten läßt, die Frage nämlich, wieweit sind welche Bezirke eines natürlichen Huminsäureteilchens im Zuge einer inneren Humifizierung fortgeschritten und wie läßt sich daraus ein Bild der äußeren Humifizierung gewinnen?

Literatur

[1] Kickuth, R.: Diss. Göttingen 1959. — [2] Nikitin, N. J.: Die Chemie des Holzes, Berlin 1955. — [3] Pawelke, G.: Diss. Göttingen 1959. — [4] Scheffer, F., u. H. Schlüter: Z. Pflanzenernähr. Düng. Bodenkunde **84**, 184 (1959). — [5] Scheffer, F., u. W. Ziechmann: Zur Chemie der Huminsäure-Vorstufen, im Druck. — [6] Scheffer, F., W. Ziechmann, H.-D. Becker u. H. Schlüter: Naturwissenschaften **42**, 71 (1955); vgl. diese Z. **152**, 305 (1956). — [7] Scheffer, F., W. Ziechmann u. R. Kickuth: Über Abbauversuche an einer natürlichen Huminsäure, in Vorbereitung. — [8] Scheffer, F., W. Ziechmann u. G. Pawelke: Z. Pflanzenernähr. Düng. Bodenkunde **90**, 58 (1960). — [9] Scheffer, F., W. Ziechmann u. G. Pawelke: in Vorbereitung. — [10] Scheffer, F., W. Ziechmann u. H. Schlüter: Kolloid-Z. **160**, 1 (1958). — [11] Scheffer, F., W. Ziechmann u. H. Schlüter: Naturwissenschaften **64**, 143 (1959). — [12] Scheffer, F., W. Ziechmann u. H. Schlüter: Z. Pflanzenernähr. Düng. Bodenkunde **85**, 32 (1959). — [13] Scheffer, F., W. Ziechmann u. J. Schmidt: Z. Pflanzenernähr. Düng. Bodenkunde **80**, 126 (1958). — [14] Scheffer, F., W. Ziechmann u. H. Scholz: Z. Pflanzenernähr. Düng. Bodenkunde **85**, 50 (1959). — [15] Schlüter, H.: Diss. Göttingen 1957. — [16] Scholz, H.: Z. Pflanzenernähr. Düng. Bodenkunde **84**, 159 (1959). — [17] Ziechmann, W.: Brennstoff-Chem., **41**, 289 (1960). — [18] Ziechmann, W.: Brennstoff-Chem., **41**, 334 (1960). — [19] Ziechmann, W., u. R. Kickuth: Kolloid-Z., **174**, 38 (1961). — [20] Ziechmann, W., u. G. Pawelke: Landwirtsch. Forsch. **12**, 17 (1959); vgl. diese Z. **174**, 227 (1960). — [21] Ziechmann, W., u. G. Pawelke: in Vorbereitung. — [22] Ziechmann, W., u. H. Scholz: Naturwissenschaften **47**, 193 (1960). —

Priv.-Doz. Dr. W. Ziechmann,
Agrikulturchem. u. bodenkundliches Institut der Universität Göttingen,
Nikolausberger Weg 7

Max-Planck-Institut für Biochemie, München

Die Ermittlung der Konstitution einer klassischen Peptidkette

Von

GERHARD BRAUNITZER

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 17. Januar 1961)

Proteine[18] bestehen aus einer oder mehreren Peptidketten. Diese können identisch (Tabakmosaik-Virus), homolog (Hämoglobin) oder verschieden (Chymotrypsin) vorliegen. Es erweist sich als nützlich, die Konstitutionsermittlung an einer einzelnen Peptidkette durchzuführen. Bei Eiweißstoffen, die aus verschiedenen Ketten bestehen, empfiehlt es sich daher, erst die Trennung in die einzelnen Komponenten durchzuführen; hierdurch werden die Verhältnisse übersichtlicher, die qualitativen aber auch die quantitativen Untersuchungen klarer. Daher beschränke ich mich auf die Konstitutionsermittlung einer solchen Kette.

Unter Konstitution verstehen wir die chemische Struktur oder „Primärstruktur" eines Proteins. Da die Bausteine, die Aminosäuren, bekannt sind, liegt die Aufgabe bei der Bestimmung der covalenten Bindungen dieser Bausteine untereinander.

Zur Kenntnis der vollständigen Struktur, d. h. der Lage der Atome im Raum (10000), sind in jüngster Zeit auch physikalische Methoden entwickelt worden. Durch die im Jahre 1954 GREEN, INGRAM u. PERUTZ[10] erstmals gelungene isomorphe Substitution am Hämoglobin scheint durch röntgenographische Analyse eine sehr wesentliche gegenseitige Ergänzung und Perfektionierung solcher Untersuchungen möglich.

Eine klassische Peptidkette besteht im allgemeinen aus 120 bis 160 Aminosäuren. Das Mol.-Gewicht beträgt im Durchschnitt um 15000. Bei vielen Proteinen zeigt sich, daß ihr Mol.-Gewicht um 17500, der früher oft diskutierten Svedberg-Konstante, liegt.

Die analytischen Untersuchungen an einem so großen Molekül sind mit den heutigen Methoden kaum und nur in beschränktem Umfange möglich. Man zerlegt daher ganz generell die Peptidkette in Bruchstücke, die anschließend zur detaillierten Untersuchung gelangen, bei der sowohl in qualitativer wie quantitativer Hinsicht exakte Ergebnisse erhalten werden können. Im zweiten Stadium muß die Peptidkette aus diesen Bausteinen, wie sie nach dem Abbau erhalten wurden, wieder aufgebaut werden, d. h. es muß die Lage der einzelnen Spaltstücke in der ursprüng-

lichen Peptidkette ermittelt werden. Durch Aneinanderreihung sämtlicher Spaltprodukte ergibt sich anschließend eine Partialformel des Proteins.

Im dritten Schritt wird die Konstitution oder Sequenz der Aminosäuren in den Spaltprodukten, die mit chemischen oder fermentativen Methoden durchgeführt wird, ermittelt, woraus sich die Konstitution des Gesamtmoleküls ergibt.

Im folgenden werden diese einzelnen Schritte der Analyse besprochen. Dabei liegt das Gewicht in erster Linie auf der Methodik: hierbei soll nur das bereits Bewährte genannt werden und ich möchte lediglich zum Abschluß auf weitere Möglichkeiten zurückkommen.

Spaltung der Proteine

Isolierung und Charakterisierung der Spaltprodukte

Wie einführend erwähnt, muß im ersten Schritt das Protein für detaillierte Untersuchungen in Bruchstücke zerlegt werden.

Diese Zerlegung muß gerichtet erfolgen: um eine übersichtliche Anzahl von Spaltprodukten zu erhalten, muß die Spaltung an definierten Stellen quantitativ erfolgen. Dies ist mit chemischen Methoden nicht oder in nur beschränktem und unvollkommenem Maße möglich. Fermentativ gelingt dies — wie Hirs, Stein u. Moore[14] erstmals zeigten — mit einer einzigen Endopeptidase, nämlich dem Trypsin. Die Spaltung selbst an einem Protein so durchzuführen, wie dies an synthetischen Substanzen gelingt, bedarf einer gewissen Erfahrung. Die meisten Proteine werden in nativer Form überhaupt nicht angegriffen. Tabakmosaikvirus, Hämoglobin, Lysozym, aber auch andere Proteine können längere Zeit der Einwirkung des Enzyms ausgesetzt werden, ohne daß sie merklich angegriffen werden. Das Protein muß, um vom Ferment gespalten zu werden, erst in einen anderen Faltungszustand gebracht werden: es wird, wie man sagt, denaturiert. Eine richtige Denaturierung ist unter Umständen eine diffizile Prozedur. Denaturierte Proteine sind bekanntlich unlöslich, und als solche werden sie ebenfalls von Fermenten nicht oder nur kaum angegriffen. Ist die Denaturierung aber nicht hinreichend erfolgt, so ist die Spaltung nicht quantitativ. Besonders störend ist, daß mehr Spaltprodukte, als theoretisch zu erwarten sind, erhalten werden, was auch die anschließende Trennung komplizierter gestaltet. Insbesondere werden hierbei sogenannte ditryptische Peptide erfaßt. In geringer Menge scheinen jedoch solche Dimere bei jedem Protein auch nach optimaler Spaltung vorzuliegen.

Die Spaltung kann quantitativ verfolgt werden, einmal durch quantitative Ninhydrinreaktion[22], wobei die freigelegten Aminogruppen gemessen werden, woraus ohne weiteres die Ausbeute bei der Spaltung berechnet

werden kann. Eine zweite Möglichkeit ist die direkte und kontinuierliche Messung der Spaltung bei p_H 8,0 im p_H-Stat[16]. Dieses Gerät, das auch Autotitrator genannt wird, kompensiert durch automatische Zugabe von Lauge die durch die Spaltung einer Peptidbindung bewirkte p_H-Verschiebung. Die verbrauchte Natronlauge ist direkt proportional der Anzahl der gespaltenen Peptidbindungen. Das selbstregistrierende Gerät gestattet daher eine unmittelbare Verfolgung des Reaktionsablaufes (vgl. Abb. 1).

Die Spaltung soll möglichst in kurzer Zeit beendet sein: früher spaltete man 20—24 Std, heute werden Zeiten von 2—4 Std bevorzugt, da hierdurch die früher beobachteten Nebenreaktionen (unspezifische Spaltung) vermieden werden.

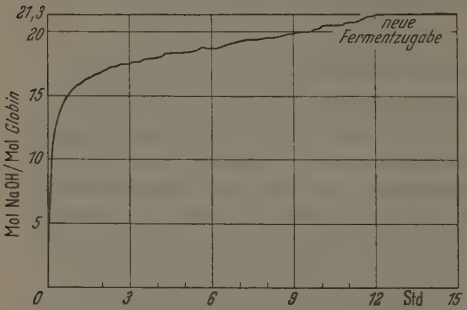


Abb. 1. Tryptische Spaltung von 24,2 μMol Humanglobin im p_H-Stat nach JACOBSON-LEONIS: 2% Trypsin (vorbehandelt mit 0,0625 n Salzsäure), p_H 8,0 und 37° C. Nach 12stündiger Inkubation wurde, auch nach erneuter Fermentzugabe, kein weiterer Laugenverbrauch mehr registriert

Die in jüngerer Zeit beschriebenen Reinigungsverfahren für Trypsin (elektrophoretisch und chromatographisch) erhöhen die Sicherheit, daß die Spaltung frei von Nebenreaktionen verläuft. Trypsin spaltet als Endopeptidase an dem C-terminalen Ende der Aminosäuren Lysin und Arginin. Die Spezifität hängt nur von der Primärstruktur ab. Da die meisten Proteine etwa 10% an basischen Aminosäuren enthalten, werden nach Spaltung im Durchschnitt 10—15 Spaltprodukte erhalten, eine Zahl, die noch leicht übersehbar ist; sie können durch die heutigen Methoden gut aufgetrennt werden.

Anschließend müssen die in einem tryptischen Hydrolysat enthaltenen Spaltprodukte getrennt, gereinigt und charakterisiert werden.

Um aus den isolierten Spaltprodukten auf die ursprüngliche Kette zu schließen, ist es notwendig, daß bei der folgenden Trennung *sämtliche* Spaltprodukte erhalten werden: in diesem, und nur in diesem Fall ist der Erfolg der Arbeit gewährleistet. Das Fehlen eines einzigen Spaltstückes, und sei es noch so klein würde den Erfolg der Arbeit in Frage stellen.

Die Anforderungen, die an das Verfahren gestellt werden, sind groß: Proteine besitzen zum Teil eine sehr verschiedene Aminosäurezusammensetzung. Einige der Spaltprodukte sind z. B. sehr basisch, andere wieder stark sauer, einige enthalten eine große Anzahl aromatischer oder hydrophyler Reste in der Seitenkette. Andererseits erhält man nach fermenta-

tiver Spaltung Produkte von sehr verschiedener Größe: von freien Aminosäuren (Lysin, Arginin), Dipeptiden bis zu Spaltprodukten der Größe des Insulins, die bereits Proteincharakter haben.

Die Entwicklung von Methoden zur Trennung von Spaltprodukten ist daher von zentraler Bedeutung für die Ermittlung der Konstitutionsaufklärung der Proteine. Es ist ohne Übertreibung zu sagen, daß der Mangel an guten Trennmethoden der Hauptgrund war, daß nach den Arbeiten von HIRS, STEIN u. MOORE[14] über Ribonuclease die weiteren Fortschritte nur gering waren.

Natürlich wurde viel versucht und vorgeschlagen: Der Erfolg war jedoch gering. Meistens war das Verfahren für eine spezielle Problemstellung von Bedeutung, eine generelle Anwendbarkeit jedoch nicht möglich.

Die heutigen Methoden zur Trennung von Spaltprodukten eines Proteins können wir, ganz allgemein betrachtet, in zwei Gruppen unterteilen:

Die ersten sind diejenigen, die Papier als Träger verwenden. Es ist dies die Verteilungschromatographie, und zwar 1- oder 2-dimensional. Sie wurde bekanntlich von MARTIN u. Mitarb.[8] erstmals am Gramicidin angewendet, klassisch sind die Insulinarbeiten von SANGER u. Mitarb.[7]. Die letzte methodische Entwicklung dieser Gruppe ist die Kombination von Hochspannungselektrophorese und Verteilungschromatographie; es ist das bekannte „Finger Printen", das von INGRAM[15] eingeführt wurde. Diese Methoden, die wir, um ihnen einen Namen zu geben, die „Cambridge-Methoden" nennen wollen, sind dadurch gekennzeichnet, daß sie mit nur wenig Substanz arbeiten und von analytischem, nicht präparativem Charakter sind. Der Arbeitsaufwand ist gering, sie arbeiten schnell. Die Ergebnisse sind jedoch qualitativ und selektiv, bei einfachen Verbindungen wie z. B. Insulin ohne weiteres anwendbar, sie versagen bei größeren Peptiden oder da, wo einige Aminosäuren dominieren, z. B. beim Hämoglobin.

Die zweite Gruppe von Methoden sind die Säulenmethoden, wie sie erstmals von MOORE, STEIN und HIRS entwickelt wurden; sie stellen im Prizip eine Modifizierung der Methode zur Analyse der Aminosäuren dar[21]. Diese Autoren verwenden ausschließlich Säulen. Die Trennung nach diesem Verfahren ist aus Abb. 2 und 3 ersichtlich.

Da unter einem Gipfel nie oder nur selten ein analysenreines Peptid erhalten wird, wird jede einzelne Komponente rechromatographiert, wobei die Versuchsbedingungen (p_H, Temperatur, Ionenstärke) variiert werden. Dies bedingt einen sehr großen Arbeitsaufwand. Der Vorteil der Methoden besteht darin, daß mit größeren Mengen, und zwar in präparativem Maßstab (z. B. 50 μMol) gearbeitet werden kann. Hierdurch ist auch der methodische Anschluß an die automatische, quantitative Aminosäure-

bestimmung gegeben. Die einzelnen Spaltprodukte werden quantitativ vermessen. Durch die Einführung quantitativer Aspekte in die Arbeit ist es erst möglich geworden, eine klassische Peptidkette chemisch zu erschließen. Diese Methoden, die wir die „Rockefeller"-Methoden nennen wollen, sind dadurch gekennzeichnet, daß sie aufwendiger sind, präparativen Charakter besitzen und durch die quantitative Kontrolle freier von subjektiven Momenten sind.

Die Versuche, die mit dem Dowex 50-Verfahren erzielten Erfolge an der Ribonuclease auf andere Proteine zu übertragen, sind fehlgeschlagen. Das Verfahren ist daher, zumindest in der Form, wie sie HIRS, STEIN und

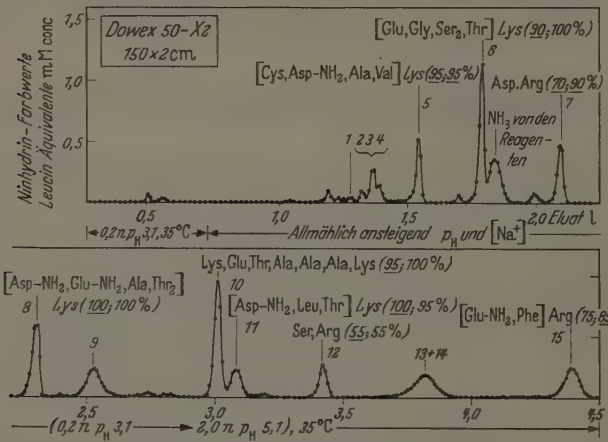


Abb. 2. Isolierung und Auftrennung der tryptischen Peptide der Ribonuclease nach dem Dowex 50×2-Verfahren (HIRS, MOORE, STEIN)

MOORE anwandten, bei vielen anderen Proteinen nicht anwendbar. Analysiert man die Gründe, so erhält man das überraschende Ergebnis, daß das Verfahren *zu selektiv* arbeitet, d. h. die Trennung ist nur für einen Teil der Peptide, wie sie nach der Spaltung erhalten werden, anwendbar. Am störendsten erweist sich der Umstand, daß oft mehrere Peptide in der Säule festgehalten werden. Untersucht man den Grund, so zeigt sich, daß das Verfahren nach mehreren Parametern arbeitet. Einerseits erfolgt eine Trennung durch Austausch, d. h. hinsichtlich der Ladung. Aber auch die Größe des Peptides scheint für den Austritt aus der Säule von großer Wichtigkeit. Ferner spielen noch Wechselwirkungen van der Waalscher Natur mit der Matrize des Austauschers eine Rolle. Spaltprodukte, die z. B. viele Aromaten enthalten, werden so verzögert, daß ein Austritt solcher Peptide nur unter sehr drastischen Bedingungen zu erreichen ist.

Eine Lösung dieser Probleme glauben wir in unserem Institut gefunden zu haben. Herr V. RUDLOFF hat in seiner Diplomarbeit ein neues Verfahren entwickelt, das wir Dowex 1×2-Verfahren[6,17] nennen. Der Träger ist ein Anionenaustauscher: die Chromatographie, der Start des Versuches beginnt bei p_H 8, und durch einen Gradienten mit Essigsäure kann das p_H erniedrigt und der Austritt des Peptids bewirkt werden.

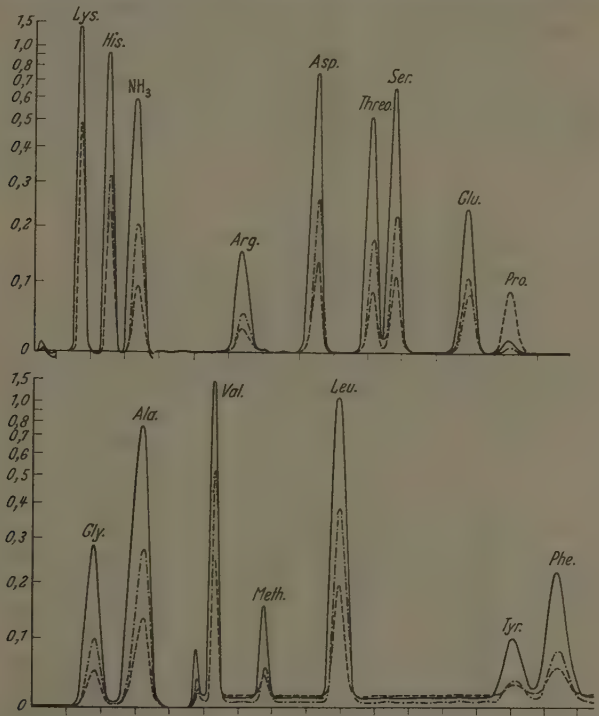


Abb. 3. Extinktionsdiagramm der quantitativen Aminosäurebestimmung nach SPACKMAN, STEIN u. MOORE (automatisch mit dem Gerät der Firma Beckman, Fulerton, USA)

Der Vorteil des Verfahrens liegt in zwei Punkten: Der Arbeitsaufwand durch Verwendung von Pyridinacetat wird gegenüber dem Dowex 50×2-Verfahren mindestens auf $^1/_5$ reduziert. Die Entsalzung entfällt, und die Fraktionen können direkt nach Rotationsverdampfen für weitere analytische Untersuchungen verwendet werden (siehe Abb. 4 und 5).

Ein zweiter wesentlicher Vorteil des Verfahrens liegt darin, daß die Trennung der Spaltprodukte nur nach einem Parameter, nämlich ausschließlich *hinsichtlich der Ladung*, erfolgt. Dies scheint von zentraler

Bedeutung zu sein. Denn es erweist sich als hinreichend, auf dieser Basis die Spaltprodukte einer Peptidkette zu trennen. Hierdurch wird das Peptidspektrum, das getrennt werden kann, wesentlich *erweitert*, und es

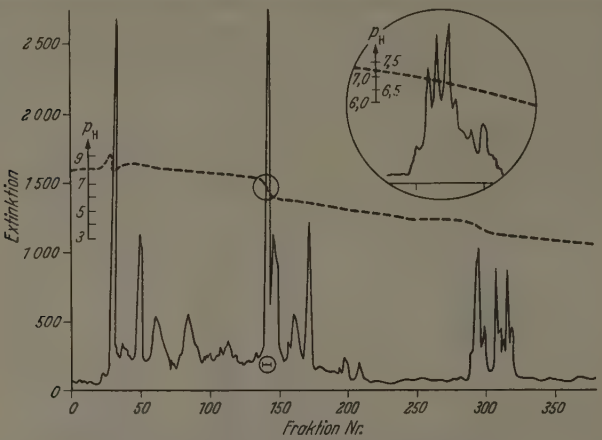


Abb. 4. Auftrennung der peptischen Peptide der α-Kette aus Humanhämoglobin nach dem Dowex 1×2-Verfahren. (RUDLOFF u. BRAUNITZER, unveröffentlicht)

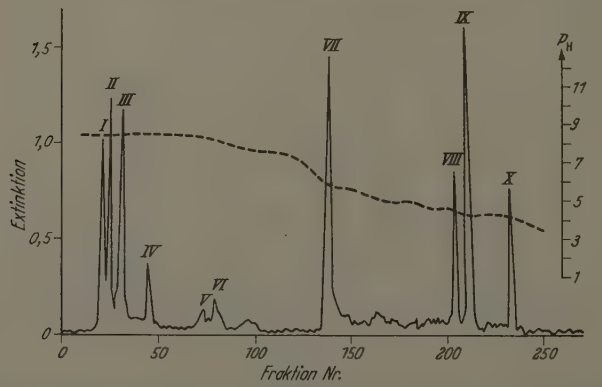


Abb. 5. Auftrennung der tryptischen Peptide der α-Kette, der langsamen Komponente des Pferdehämoglobins nach dem Dowex 1×2-Verfahren (MATSUDA und BRAUNITZER, unveröffentlicht)

scheint, daß das Dowex 1×2-Verfahren einen sehr breiten Anwendungsbereich besitzt. Von großer Wichtigkeit ist die Isolierung großer Peptide (40—50 Aminosäuren). Diese konnten in mehreren Fällen auch aus Säulen von 150 cm Höhe eluiert werden. Neben diesem prinzipiellen Vorteil muß ich auch auf den geringen Arbeitsaufwand des Verfahrens

hinweisen. Durch Verwendung von Pyridinacetat wird die Entsalzung überflüssig: Hierdurch ist der methodische Anschluß an weitere analytische Operationen, wie Papierchromatographie oder Hochspannungselektrophorese, ohne weiteres möglich. Methodisch gesprochen: Das Dowex 1×2-Verfahren nimmt eine Mittelstellung zwischen den „Cambridge"- und den „Rockefeller"-Methoden ein. Es verbindet die quantitativen Aspekte der „Rockefeller"-Methode mit der Schnelligkeit des „Cambridge"-Verfahrens. *Hierdurch wird die Sicherheit der Aussagen der ersteren mit dem geringen Arbeitsaufwand der anderen gekoppelt.*

Ich glaube, daß die Richtigkeit unserer methodischen Konzeption durch nichts besser unter Beweis gestellt werden kann als durch die Tatsache, daß innerhalb einer sehr kurzen Zeit 3 Peptidketten nach dieser Methode erschlossen wurden.

Der Aufbau der Peptidketten aus den Bruchstücken

Durch Spaltung, Isolierung und quantitative Charakterisierung der Spaltprodukte haben wir einerseits einen quantitativen Überblick über das Molekül bekommen, andererseits jedoch die Voraussetzung geschaffen, die chemischen Studien an den Spaltprodukten durchzuführen.

Anschließend wird die Lage der Spaltprodukte in der Peptidkette ermittelt. Hierzu sind zwei Wege möglich: 1. die Einschränkung der Spezifität des Trypsins durch Modifikation des Proteins, oder 2. die entsprechenden sogenannten Brückenpeptide zu suchen, aus denen sich die Lage der tryptischen Spaltprodukte ergibt.

Das erste Verfahren wurde von Anfinsen[3] eingeführt und hat einen wichtigen Beitrag zur Strukturaufklärung der Ribonuclease geliefert. Anfinsen setzt die ε-NH_2 Gruppe des Proteins mit Fluordinitrobenzol um. Hierdurch wird das Lysin eine neutrale Aminosäure, die Spaltung erfolgt daher nur noch am Arginin, wobei eine wesentlich geringere Anzahl von Spaltprodukten erhalten wird. Nach Trennung derselben und Ermittlung der Bruttoformel kann auf diese Weise die Lage der tryptischen Peptide weitgehend eingeschränkt werden. Durch Isolierung der Arginylpeptide kann durch wenig Arbeit (Sequenz der Arginylpeptide) die Lage der 4—5 Gruppen bestimmt werden! Durch Anwendung des Carboxybenzoxyrestes kann nach erfolgter tryptischer Spaltung der Rest — in Analogie zu den Methoden der Peptidchemie — wieder entfernt werden, wobei nach Auftrennung der Komponente eine weitere Spaltung möglich ist[2].

Leider, so elegant dieses Verfahren auch ist, sind die meisten substituierten Proteine — im Gegensatz zur Ribonuclease — unlöslich und daher fermentativ nicht angreifbar. Es wurde deshalb versucht, die Blockierung des ε-Lysins mit anderen Reagentien, wie Bromessigsäure,

durchzuführen. Leider sind solche Derivate infolge ihres stark sauren Charakters nur schwer zu handhaben.

In unserem Institut hat Herr HILSCHMANN[5,13] ein sehr einfaches Verfahren entwickelt, das einen fast systematischen Aufbau einer Peptidkette erlaubt. Wir nennen es „das Verfahren der wechselseitigen fermentativen Spaltung". Durch gesonderte Spaltung der Kette, z.B. mit

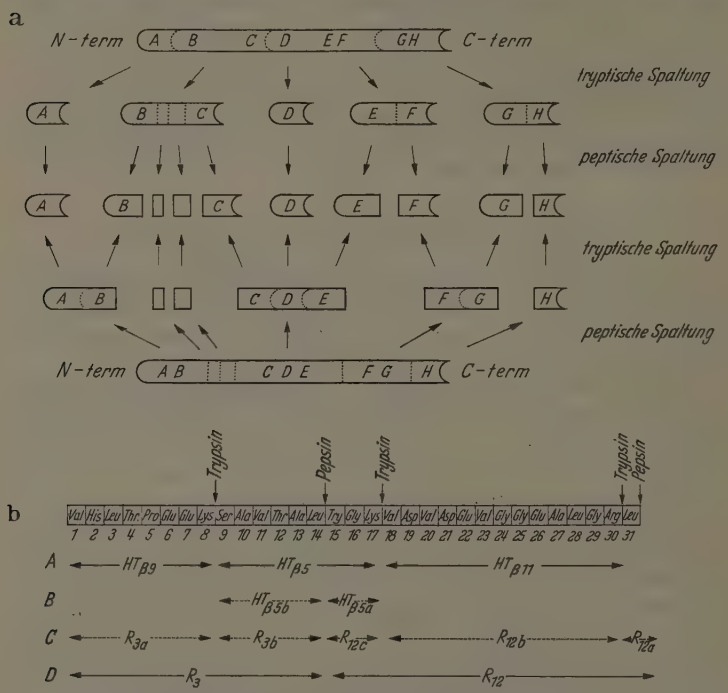


Abb. 6. a Schematische Darstellung zur Bestimmung der Lage der tryptischen Peptide innerhalb einer Peptidkette; b Bestimmung der drei terminalen tryptischen Peptide der β-Kette aus Humanhämoglobin

Pepsin oder Chymotrypsin, und Trennung über eine Dowex 1×2-Säule, werden die „Brückenpeptide", d. h. diejenigen, die Lysin und Arginin enthalten, gesucht und anschließend mit Trypsin gespalten. Dadurch werden die Verbindungsstellen erhalten. Werden nun die tryptischen Peptide mit Pepsin oder Chymotrypsin andererseits gespalten, so werden identische Peptide, die aus denselben Bereichen der Peptidkette stammen, erhalten, wodurch eine Zuordnung der tryptischen Peptide mit großer Sicherheit erfolgen kann. Der Arbeitsaufwand ist gering. Wir

konnten z.B. mit 50 μMol Substanz in relativ kurzer Zeit beide Peptidketten des Humanhämoglobins aufbauen (siehe Abb.6).

Der Vorteil dieses Verfahrens ist, daß es ohne Kenntnis der Sequenz möglich ist, einen Rückschluß auf die Gesamtstruktur durchzuführen.

Einfacher, aber, ich glaube, nicht so elegant, ist die Zuordnung so durchzuführen, daß erst die Sequenz sämtlicher Peptide ermittelt wird und anschließend aus den Spaltprodukten der peptischen Peptide auf die Reihenfolge geschlossen werden kann.

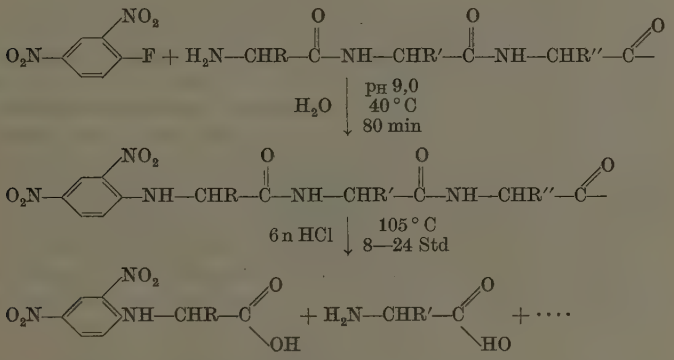
Sequenzanalyse

Nach erhaltener Partialformel muß die Struktur durch Sequenzanalyse vervollständigt werden.

Hierzu ist eine große Anzahl von Vorschlägen gemacht worden, in der Praxis werden nur ganz wenige verwendet. Bewährt haben sich lediglich einige chemische und fermentative Methoden.

Chemische Methoden

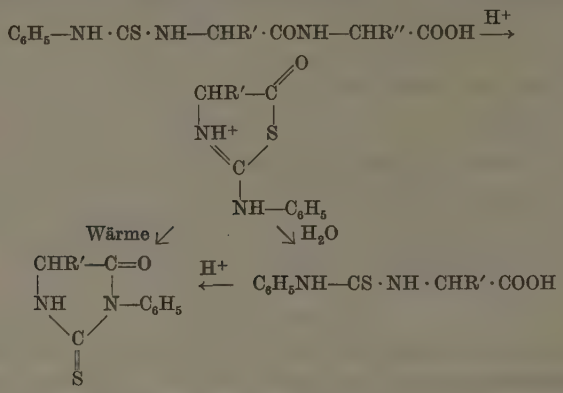
Die chemischen Methoden sind in zwei Gruppen zu gliedern: 1. Die Blockierungsmethoden. Das klassische Beispiel — und auch das einzige, das angewendet wird — ist die Ihnen allen bekannte DNP-Methode:



Nach Blockierung und anschließender totaler oder partieller Hydrolyse kann die N-terminale Aminosäure, oder einige, die ihr benachbart sind, ermittelt werden, Diese Methode, die eigentlich die Erschließung der Konstitution der Peptide ermöglicht, wird jedoch heute infolge der großen Mengen an Substanz, die zu einer Untersuchung benötigt werden, immer weniger gebraucht. Sie ist und bleibt jedoch ein Standard Verfahren (insbesondere bei Proteinen)[19].

2. Die zweite Gruppe der chemischen Methoden sind die Methoden des schrittweisen Abbaus, wie sie vor sehr langer Zeit von Abderhalden u.

BROCKMANN[1] vorgeschlagen und erstmals angewandt und von EDMAN[9] erstmals in einer generell brauchbaren Form vorgelegt wurden. Durch eine Cyclisierungsreaktion wird schrittweise, am N-terminalen Ende beginnend, eine Aminosäure nach der anderen aus dem Peptidverband entfernt:



Es gibt eine große Anzahl von Modifikationen dieses Abbaus, und es gelingt im Durchschnitt, mehrere Aminosäuren in ihrer Position zu erfassen. Leider gelingt es nicht, in der Praxis den schrittweisen Abbau beliebig oft durchzuführen. Ein großer Vorteil dieses Verfahrens ist, daß die als Thiohydantoin abgespaltene Aminosäure mit sehr empfindlichen Sprühtesten nachgewiesen werden kann, mit anderen Worten, es kann mit sehr geringen Substanzmengen gearbeitet werden[20]. Uns scheint die Modifikation durch doppelte Kontrolle des Abbaus, d. h. die Charakterisierung des Thiohydantoins der abgespaltenen Aminosäure sowie die Kontrolle durch quantitative Vermessung des Restpeptids, wobei jeweils die abgespaltene Aminosäure in dem Restpeptid fehlen muß, die Methode der Wahl zu sein.

Fermentative Methoden

Diese erfreuen sich unter den Proteinchemikern einer besonderen Beliebtheit, denn die Versuchsbedingungen sind die schonendsten, eine Modifizierung der Peptidkette, wie sie bei jeder chemischen Reaktion immer in Betracht gezogen werden muß, ist hier am geringsten. Zwei Proteasen stehen heute im Vordergrund: Die Carboxypeptidase[11] und die Aminopolypeptidase[12]. Beide ergänzen sich in idealer Weise. Carboxypeptidase A und B spaltet schrittweise vom Carboxylende einer Peptidkette. Nach Entfernung der C-terminalen Aminosäure wird in der verkürzten Peptidkette die nun vorliegende C-terminale Aminosäure

entfernt, usw. Im allgemeinen kann auf diesem Wege auf die Sequenz von 1—4 Aminosäuren am C-terminalen Ende geschlossen werden (siehe Abb. 7). Der Erfolg hängt stark von der Natur der Reste und ihrer Reihenfolge ab. Besonders leicht werden aromatische Aminosäuren und solche mit langen Seitenketten abgespalten, Prolin z.B. gar nicht. Basische Aminosäuren werden nur von Case-B gespalten, wobei durch Kombination dieser beiden Proteasen unter Umständen sehr interessante Ergebnisse erhalten werden können.

Von großer Bedeutung ist das entsprechende Enzym, die Aminopolypeptidase, da sie in jüngster Zeit auch kommerziell erhältlich ist — wodurch die langwierige Aufarbeitung umgangen werden kann —, wird sie in Zukunft sicher eine weitere Verbreitung und Anwendung erfahren.

Ich kann hier nicht näher auf die verschiedenen Aminopolypeptidasen eingehen, möchte jedoch nur bemerken, daß die Aminopolypeptidase im allgemeinen kräftiger spaltet.

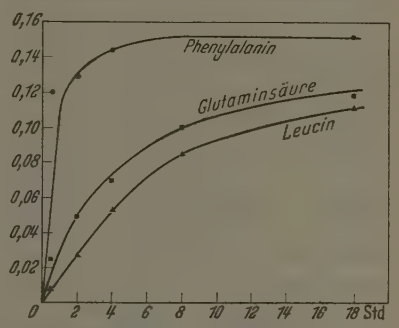


Abb. 7. Bestimmung der C-terminalen Sequenz mit Carboxypeptidase (ACTH)

Zusammenfassend ist zu sagen:

Die Methoden zur Konstitutionsermittlung eines Proteins wurden in jüngster Zeit wesentlich perfektioniert. Die Spaltung, Trennung und Charakterisierung der tryptischen Spaltprodukte und ihre Zuordnung erfordert zwar noch viel Erfahrung, kann heute aber fast systematisch durchgeführt werden. Einer wesentlichen Vereinfachung bedarf noch die Sequenzanalyse, diese benötigt noch den größten Arbeitsaufwand.

Obzwar der Fortschritt befriedigend ist, sind wir jedoch noch weit da von entfernt, den heute gestellten Anforderungen zu entsprechen. Um dies zu erreichen, wird es sicherlich noch vieler Arbeit und Versuche und, wie ich glaube, insbesondere der Zusammenarbeit, bedürfen. Für den Fermentchemiker, den präparativen organischen Chemiker und insbesondere den Peptidchemiker warten noch viele Aufgaben.

Ein sehr wesentliches Problem stellen die Methoden zur einfacheren und schnelleren Charakterisierung aller Bausteine dar. Ob hierbei die physikalischen Methoden (z.B. Massenspektroskopie[4]) nicht nur an Modellsubstanzen, sondern auch an natürlichen Peptiden Erfolg haben, wird die Zukunft zeigen: der methodische Anschluß scheint möglich.

Bei vereinfachter Arbeitsweise werden auch viele Probleme, die die Strukturermittlung heute stellt, gelöst werden. Man darf nicht vergessen,

daß die Sequenzanalyse selbst heute nicht nur für den Proteinchemiker von Interesse ist. Die genetischen Aspekte der Proteinstruktur und alle die damit verbundenen Probleme stellen neue Aufgaben. Ich möchte sehr auf die komparativen Aspekte der Untersuchungen, die heute in steigendem Maße an Bedeutung gewinnen, hinweisen. Es mag überraschend klingen, aber ich glaube, daß die Entwicklung einer Methode, die gestattet, nicht nur die Bruttoformel, sondern die Sequenz selbst zu analysieren und zu vergleichen, für die Zukunft von eminenter Bedeutung sein wird.

Literatur

[1] Abderhalden, E., u. H. Brockmann: Biochem. Z. **225**, 386 (1930). — [2] Anfinsen, C. B.: Arch. Biochem. Biophysics **65**, 156 (1956). — [3] Anfinsen, C. B., u. R. R. Redfield: J. biol. Chemistry **221**, 385 (1956). — [4] Biemann, K., F. Gapp u. J. Seibl: J. Amer. chem. Soc. **81**, 2274 (1959). — [5] Braunitzer, G., N. Hilschmann u. R. Müller: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **318**, 284 (1960). — [6] Braunitzer, G., B. Liebold, K. Hilse u. V. Rudloff: Angew. Chem. **71**, 376 (1959). — [7] Brown, H., F. Sanger u. R. Kitai: Biochemic. J. **60**, 556 (1955). — [8] Consdon, R., A. H. Gordon, A. J. P. Martin u. R. L. M. Synge: Biochemic. J. **41**, 596 (1947). — [9] Edman, P.: Acta chim. scand. **4**, 277, 283 (1950); vgl. diese Z. **143**, 40 (1954). — [10] Green, D. W., V. W. Ingram u. F. M. Perutz: Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A **225**, 287 (1954). — [11] Harris, J. I.: in D. Glick, Methods of Biochem. Analysis, Bd. II, Intersci. Publ. Inc., New York 1956, S. 397. — [12] Hill, R. L., D. H. Spackman, D. M. Brown u. E. L. Smith: Biochem. Preceparations, John Wiley & Sons, Inc. New York 1958, Bd. VI, S. 35. — [13] Hilschmann, N., u. G. Braunitzer: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **317**, 285 (1959). — [14] Hirs, C. H. W., W. H. Stein u. S. Moore: J. biol. Chemistry **221**, 151 (1956). — [15] Ingram, V. M.: Nature (London) **178**, 792 (1956). — [16] Jacobson, C. F , u. Léonis: C. R. Trav. Lab. Carlsberg, Sér. chim. **27**, 333 (1951). — [17] Rudloff, V., u. G. Braunitzer: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem., im Druck. — [18] Sanger, F.: Advances Protein Chem. VII, 1 (1952). — Anfinsen, C. B., u. R. R. Redfield: Advances Protein Chem. XI, 1 (1956). — Braunitzer, G.: Angew. Chem. **69**, 189 (1957). — [19] Sanger, F.: Biochemic. J. **39**, 507 (1945). — [20] Sjöquist, J.: Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) **41**, 201 (1960). — [21] Spackman, D. H., W. H. Stein u. S. Moore: Analyt. Chemistry **30**, 1190 (1958); vgl. diese Z. **167**, 224 (1959). — [22] Stein, W. H., u. S. Moore: J. biol. Chemistry **176**, 337 (1948).

Dr. G. Braunitzer, Max-Planck-Institut für Biochemie, München 15, Goethestr. 31

Organisch-chemisches Institut der Technischen Universität Berlin

Anwendung von Trifluoressigsäure bei der Analyse von Aminosäuren und Peptiden

Von
G. KRESZE und V. SCHMIDT

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 17. November 1960)

Wie WEYGAND u. Mitarb.[7] in einer ganzen Reihe von Arbeiten gezeigt haben, läßt sich beim *synthetischen* Arbeiten in der Peptidchemie die Trifluoressigsäure (TFA) aus 2 Gründen mit sehr gutem Erfolg einsetzen:

1. Aminosäuren, Peptide und auch Proteine sind in Trifluoressigsäure im allgemeinen leicht bis sehr leicht löslich.

2. der CF_3CO-Rest ist als Schutz für die Aminogruppen leicht einzuführen und alkalisch wieder leicht abspaltbar.

Es lag daher nahe, die Trifluoressigsäure und die N-TFA-Aminosäuren auch bei der *Analyse* in der Peptidchemie einzusetzen. WEYGAND[7] zeigte, wie man N-TFA-Derivate bei der Sequenzanalyse einsetzen kann; zu untersuchen blieb, wie weit man mit Hilfe von Trifluoressigsäure auch speziell Erkennung und — wenigstens teilweise — Konstitutionsaufklärung von Aminosäuren und Peptiden durchführen kann. Wir haben einige Verfahren hierzu ausprobiert.

Die oben als erster Vorteil herausgestellte leichte Löslichkeit der Aminosäuren und Peptide in Trifluoressigsäure erlaubt dabei eine Bestimmung des *Äquivalentgewichts* der Verbindungen: in dem stark sauren Medium ist die Dissoziation der freien Carboxylgruppen unterbunden, die Aminosäuren verhalten sich basenanalog. Da die Lösungen eine gute, konzentrationsproportionale elektrische Leitfähigkeit zeigen (0,1 molare Lösungen von Glycin z. B. hatten $\varkappa = 2{,}9 \cdot 10^{-4}\ \Omega^{-1}\ \mathrm{cm}^{-1}$), ist eine Bestimmung des Animosäuregehalts durch konduktometrische Titration mit Perchlorsäure in CF_3COOH möglich. Wir haben das Verfahren an einer Anzahl von Aminosäuren und einigen Peptiden erprobt[3], allein bei Tyrosin war eine Bestimmung, wahr cheinlich wegen Oxydation als Störreaktion, nicht möglich. Im allgemeinen konnten 50—200 mg Aminosäure in 40 ml Trifluoressigsäure mit einem Metrohm-Konduktometer bei einem mittleren Fehler von 2% bestimmt werden, eine Entwicklung zum Mikroverfahren scheint uns bei entsprechender Apparatur ohne Schwierigkeiten möglich. Auf diese Weise kann bequem bei Aminosäuren und Peptiden unbekannter Konstitution das Äquivalentgewicht bestimmt

werden, wir haben dies bei einigen Aminosäuren angewandt, die sich von Kohlenhydraten ableiten[6]. — Zweitens haben wir die Geschwindigkeit der alkalischen Hydrolyse von N-TFA-Aminosäuren und -peptiden untersucht. Daß die alkalische Hydrolyse rasch erfolgt, ist oben erwähnt worden, zu klären blieb — als wichtig z. B. für präparatives Arbeiten —, wie die Hydrolysengeschwindigkeit von den Reaktionsbedingungen und von der Konstitution abhängt. Wir haben auch diese Reaktion konduktometrisch verfolgt[1] und sie in wäßriger Lösung, meist bei 20° C, ablaufen lassen.

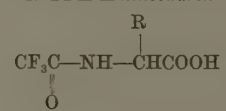
Allgemein hat sich ergeben:

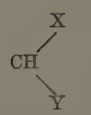
Wäßrige Lösungen von N-TFA-Aminosäuren oder ihren Natriumsalzen sind bei Zimmertemperatur über lange Zeiten hinweg stabil, die *„neutrale"* Hydrolyse der Verbindungen ist zu vernachlässigen.

Die Hydrolyse in *alkalischer* Lösung (NaOH) ist 2. Ordnung, $v = k_2 \cdot [\text{Aminosäure}] \cdot [OH^-]$

Die Geschwindigkeitskonstanten k_2 für eine Reihe von N-TFA-Aminosäuren zeigt Tab. 1.

Tabelle 1. *k_2-Werte der alkalischen Hydrolyse von N-TFA-Aminosäuren*



R =		k_2 (Liter/Mol · min)
H	Gly	8,35
CH_3	Ala	6,35
CH_2X, X = HOOC-	Asp*	2,53
$HOOCCH_2$	Glu*	2,50
C_6H_5	Phe	2,2
$(CH_3)_2CH$-	Leu	1,8
CH_3SCH_2-	Meth	1,10
 X = CH_3 Y = CH_3	Val	5,0
CH_3 C_2H_5	Ileu	5,3

* Dinatriumsalz.

Die Hydrolysengeschwindigkeit ist danach zwar nicht dramatisch, jedoch deutlich von der Konstitution des Aminosäurerestes — NHCHR · COOH abhängig:

α, β- und stark auch γ-Substitution von H im Rest R setzt die Reaktivität herab.

Ergebnisse bei verschiedenen Peptiden zeigt Tab. 2.

Tabelle 2. *k_2-Werte der alkalischen Hydrolyse von N-TFA-Peptiden* k_2(*Liter/Mol* · min)

N-TFA-Gly-gly	2,30	N-TFA-Ileu-Gly	1,54
-Gly-gly-gly	2,18	-Phe-gly	1,98
-Gly-phe	2,26	-Val-gly	2,52

Wie zu erwarten, besitzt die Hydrolysengeschwindigkeit bei Peptiden eine andere Größe als bei den entsprechenden Aminosäuren; bei den Verbindungen, deren endständige Aminogruppe von Glycin stammt, wird, soweit bisher feststellbar, in erster Näherung der k_2-Wert durch den Molekülrest nicht beeinflußt.

Die Ergebnisse beim N-TFA-Derivat einer sek. Aminosäure zeigt Tab. 3:

Tabelle 3. *k_2-Werte von Prolin*

N-TFA-Prolin 4,64; 4,42 bei 40° C	zum Vergleich:	k_2(Liter/Mol · min)
9,96 bei 45° C	N-TFA-Glycin	6,35 bei 15° C
15,70 bei 50° C		8,35 bei 20° C
		12,0 bei 25° C
		14,25 bei 30° C

Hier ist die Reaktivität sehr stark herabgesetzt, aus der Temperaturabhängigkeit der Hydrolysengeschwindigkeit bei N-TFA-Glycin und -Prolin können als Aktivierungsgrößen abgeschätzt werden:

	Aktivierungsenergie (kcal/Mol)	Stoßzahlfaktor (k_2 in l/Mol · sec)
Glycin	9,2	7,8
Prolin	25,0	18,2

Das dritte analytische Problem, das mit Hilfe von N-TFA-Derivaten vielleicht behandelt werden könnte, ist die Bestimmung der *Kettenlänge* von Peptiden. Das Verfahren, das wir untersucht haben, beruht auf folgendem Prinzip: Im IR-Spektrum der Trifluoressigsäure und ihrer Derivate lassen sich unschwer starke Banden bei 1200 cm^{-1} herausfinden, die Valenzschwingungen der CF_3-Gruppe zukommen[2]. Diese Banden treten auch in den N-TFA-Aminosäuren und N-TFA-Peptiden auf (vgl. Abb. 1). Ihre Intensität, relativ zu der von den Banden, die für die Amidstruktur der Peptide charakteristisch sind, sinkt mit steigender Zahl der Aminosäuren im Peptid. Ähnlich wie es zuerst Schiedt u. Restle[5] bei N-DNP-Peptiden [Intensitätsverhältnis von $\nu_s(NO_2)/\nu$(Amid I-Bande)] und Otting[4] bei acylierten Aminozuckern [Intensitätsverhältnis im Amid I-Banden- und ν (C-O)-Gebiet] gezeigt haben, sollte man auch hier aus dem

Intensitätsverhältnis der beiden IR-Banden, von denen die eine für die Peptidstruktur, die zweite für die CF_3-Gruppe charakteristisch ist, auf die Kettenlänge in N-TFA-Peptiden zurückschließen können.

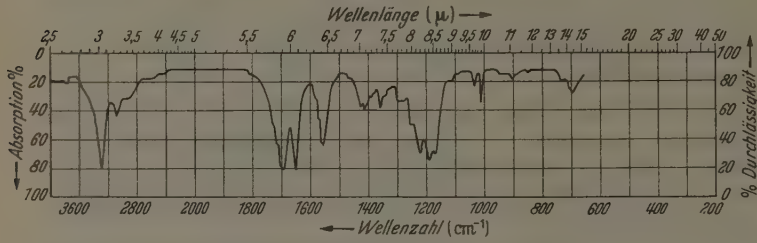


Abb. 1. IR-Spektrum von N-TFA-Glycylglycin

Dabei waren folgende Fragen zu klären:

Welche der charakteristischen Banden sind am wenigsten durch andere Absorptionen überlappt und daher zur Analyse geeignet?

Ist die Verwendung einer Maximalextinktion (wie bei SCHIEDT[5]) oder einer integralen Absorption (wie bei OTTING[4]) in diesem speziellen Fall günstig?

Die Substanzen müssen in festem Zustand spektroskopiert werden; welche Voraussetzungen sind an die Reproduzierbarkeit geknüpft?

Schließlich: besteht, wie zu hoffen, ein einfacher Zusammenhang zwischen dem Extinktionsverhältnis und der Kettenlänge, und falls ja, gilt dieser für *alle* Aminosäuren als Peptidbausteine?

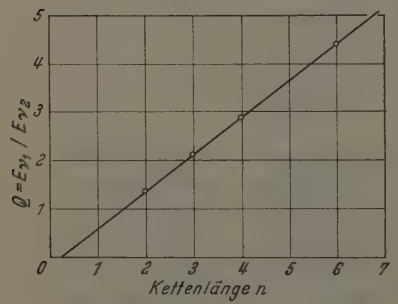


Abb. 2. $Q(n)$ bei N-TFA-Polyglycinen

Wir haben hierzu folgende Ergebnisse erhalten:

Am besten geeignet für den Intensitätsvergleich sind bei Oligopeptiden die Amid I-Bande bei 1680 cm^{-1} (ν_1) und die Teilbande 1165 cm^{-1} der für die CF_3-Gruppe charakteristischen Absorption (ν_2). Bei anderen Banden (z. B. Amid II, andere CF_3-Banden) liegt entweder das Extinktionsverhältnis zu ungünstig, oder die Absorption ist bei zu vielen Verbindungen durch Störbanden überlappt.

Am besten wird — unter den im Versuchsteil genannten Bedingungen — die scheinbare Maximalextinktion der beiden Banden (E_1 bzw. E_2) ausgewertet. Das Verhältnis der integralen Absorptionen (Bereiche 1600—1680 cm^{-1}, 1130—1270 cm^{-1}) ist stärker gegen Konstitutions-

einflüsse der Aminosäurereste anfällig und daher zur allgemeinen Kettenlängenbestimmung weniger geeignet.

Die Spektren wurden von KBr-Preßlingen der N-TFA-Peptide aufgenommen. Dabei hatten die Preßdauer der Tabletten (3—30 min bei 30 t Gesamtdruck), der Preßdruck (20—40 t Gesamtdruck bei 3 min Preßdauer), die Schichtdicke (Tabletten mit 400—600 mg KBr bei 0,7 mg Substanz), die Konzentration an Peptid (0,2—1,4 mg bei 500 mg) im günstigen Extinktionsbereich, sowie eine nachträgliche 15stündige Trocknung bei 80° C keinen Einfluß auf die Größe der Extinktionsverhältnisse, bei denen die maximale Abweichung bei verschiedenen Tabletten $\pm 5\%$ betrug.

Bei den N-TFA-Polyglycinen ($n = 2, 3, 4, 6$) liegen die Quotienten $Q = E_1/E_2$, gegen n aufgetragen, auf einer Geraden (Abb. 2), der Anstieg $\Delta Q/\Delta n$ beträgt 0,75.

Bei einer ganzen Zahl anderer Dipeptide wurde der Q-Wert bestimmt, der Mittelwert war 1,36 (Tab. 4).

Tabelle 4. *Q-Werte von Dipeptiden und Dipeptidderivaten*

N-TFA-Gly-gly	1,37
N-TFA Ala-ala	1,66
N-TFA-Ala-phe-OCH_3	1,59
N-TFA-Val-ala-OC_2H_5	1,80
N-TFA-Val-ala-OCH_3	1,41
N-TFA-Asp-gly-OC_2H_5	1,13
N-TFA-Asp-ala-OCH_3	1,11
N-TFA-Asp-Leu-OCH_3	1,29
N-TFA-Asp-val-OC_2H_5	1,55
N-TFA-Asp-phe-OC_2H_5	1,36
N-TFA-Asp-asp-$(OC_2H_5)_2$	1,39
N-TFA-Asp-glut-$(OC_2H_5)_2$	1,10
N-TFA-Asp-tyr-OC_2H_5	1,20
N-TFA-Ser-gly-OC_2H_5	1,25
N-TFA-Threo-gly-OC_2H_5	1,14
N-TFA-Ser-ala-OCH_3	1,15
N-TFA-Threo-ser-OCH_3	0,68
N-TFA-Ser-meth-OCH_3	1,35
N-TFA-Phe-ser-OCH_3	1,40
N-TFA-Ala-ser-OCH_3	1,37
N-TFA-Ser-tyr-$OCH_2C_6H_5$	1,57

Die Q-Werte zeigen etwas variable Werte, Störungen können vor allem bei hydroxylhaltigen Aminosäuren auftreten.

Freie N-TFA-Aminosäuren und deren Methyl- oder Äthylester zeigen gleiche Q-Werte (siehe Tab. 4). Auch N-TFA-Aminosäurehydrazide verhalten sich normal, die „Kettenlänge" n wird hier um eine Einheit zu hoch gefunden. Bei Tritylhydraziden ist eine Auswertung wegen Störung durch die Aromatenbanden nicht möglich.

Die Ergebnisse bei *Tripeptiden* sind die folgenden:

N-TFA-Gly-gly-gly	2,13
N-TFA-Gly-gly-gly-OC_2H_5	1,96
N-TFA-Threo-ser-ileu-OCH_3	1,87
N-TFA-Threo-val-ala-OCH_3	1,70
N-TFA-Tyr-ser-meth-OCH_3	1,29

Wieder fallen OH-haltige Verbindungen heraus; im allgemeinen sollte jedoch wegen des hohen $\Delta Q/\Delta n$-Wertes eine „Kettenlängen"-Bestimmung den richtigen Wert für n ergeben.

Ferner wurden untersucht:

Tetrapeptid: N-TFA-$(Gly)_4$	2,90
Hexapeptid: N-TFA-$(Gly)_6$-OC_2H_5	4,42

Zusammenfassend kann man sagen, daß bei Peptiden mit einer Kettenlänge bis zu 9, die aus einfachen Aminosäuren aufgebaut sind, eine Kettenlängenbestimmung mit Hilfe von IR-Spektren der N-TFA-Derivate im Prinzip möglich sein sollte.

Beschreibung der Versuche

1. Bestimmung der Hydrolysengeschwindigkeit von N-TFA-Aminosäuren und -Peptiden. 0,05—0,2 m Mol der N-TFA-Aminosäure wurden in einem Polyäthylen-Wägeröhrchen in die thermostatierte Leitfähigkeits-Meßzelle gegeben und so viel Leitfähigkeitswasser zugegeben, daß das Gesamtvolumen — einschließlich NaOH-Lösung — genau 40 ml betrug. Dann wurde unter Rühren zunächst ein Äquivalent 0,1 n NaOH-Lösung und nach einigem Stehen ein weiteres Äquivalent NaOH-Lösung hinzugefügt. Die Temperatur wurde konstant auf 20 $\pm$ 0,1° C gehalten, als Nullpunkt der Zeitmessung wurde die Zeit der Zugabe von 1,5 Äquivalent genommen. Dann wurde die Zeit-Widerstandskurve aufgenommen, Messungen erfolgten in Abständen von etwa 30 sec, gemessen wurde 35—40 min lang. Der Endwert des Widerstands hatte sich nach 3—7tägigem Stehenlassen der Lösung eingestellt.

Die Auswertung erfolgte nach dem Gesetz 2. Ordnung:

$$a/(a - x) = (R_\infty - R_0)R/(R_\infty - R)R_0$$ [1]

(R_∞ = Endwert; R_0 = Anfangswert, extrapoliert; R = Meßwert).

Die Punkte lagen auf einer Geraden, die — apparativ bedingte — Streuung konnte durch Aufnahme vieler Meßpunkte gut graphisch ausgeglichen werden.

2. Bestimmung der Kettenlänge von N-TFA-Peptiden. 0,7—1,4 mg N-TFA-Peptid wurden im Achatmörser mit 500 mg KBr verrieben und bei 30 t Gesamtdruck gepreßt, es ergaben sich klare Preßlinge. Dann wurde das IR-Spektrum mit einem Leitz-Gerät mit NaCl-Prisma (Spaltprogramm 3,0, Registriergeschwindigkeit 1,2) aufgenommen, wobei zunächst bei 2000 cm^{-1} mit Hilfe eines Gitters im Vergleichsstrahl eine Durchlässigkeit von 90% eingestellt wurde. Diese 90%ige Durchlässigkeitslinie wurde als Nullinie für die Extinktionsmessungen gewählt, bestimmt wurde die Maximalextinktion der Amid-I-Bande (1680 cm^{-1}, E_1) und der niedrigstfrequenten Teilbande der CF_3-Absorption (1165 cm^{-1}, E_2). Das Extink-

tionsverhältnis $E_1/E_2 = Q$ ist mit der Kettenlänge n durch die Näherungsgleichung $n = 2 + \frac{Q - 1{,}36}{0{,}75}$ verknüpft.

Wir danken Herrn Prof. WEYGAND für seine stete Hilfe und seinen Rat, dem Herrn Bundesminister für wirtschaftlichen Besitz des Bundes für die wesentliche Unterstützung dieser Arbeit.

Literatur

[1] FROST, A. A., u. R. G. PEARSON: Kinetics and Mechanism, Wiley & Sons, New York, Chapman & Hall Ltd. London, 1956, S. 35. — [2] FUSON u. Mitarb.: J. chem. Physics **20**, 1627 (1952). — ROBSON, D. H., u. J. REINHARDT: J. Amer. chem. Soc. **77**, 498 (1955). — KAGARISE, R. E.: J. chem. Physics **27**, 519 (1957). — [3] KRESZE, G., u. V. SCHMIDT: Chem. Ber. **90**, 1678 (1957). — [4] OTTING, W.: Liebigs Ann. Chem. **612**, 68 (1958). — [5] SCHIEDT, U., u. H. RESTLE: Z. Naturforsch. **9b**, 182 (1954); vgl. diese Z. **145**, 197 (1955). — [6] WEYGAND, F., u. H. RINNO: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **306**, 173 (1957); vgl. diese Z. **163**, 316 (1958). — [7] WEYGAND, F., u. W. SWODENK: Chem. Ber. **93**, 1693 u. früher (1960). — WEYGAND, F., u. E. LEISING: Chem. Ber. **87**, 248 (1954). — WEYGAND, F., u. R. GEIGER: Chem. Ber. **89**, 647 (1956). — WEYGAND, F., R. GEIGER u. U. GLÖCKLER: Chem. Ber. **89**, 1543 (1956). — WEYGAND, F., R. GEIGER u. W. SWODENK: Angew. Chem. **68**, 307 (1956). — WEYGAND, F., B. KOLB u. P. KIRCHNER: diese Z. **181**, 396 (1961).

Organisch-Chemisches Institut der Technischen Universität,
Berlin-Charlottenburg, Straße des 17. Juni

Institut für physikalische Chemie der Universität Frankfurt a. M.

Analytische Probleme bei kinetischen Untersuchungen über die Spaltung von Di- und Tripeptiden

Von

H. HARTMANN, J. HEIDBERG, J. HEINTGES und H. JUNG

Mit 1 Textabbildung

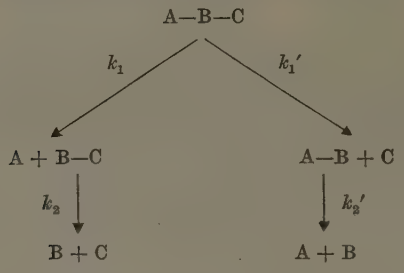
(Eingegangen am 14. November 1960)

Einführung und Problemstellung

Über die Kinetik der Spaltung von einfachen Peptiden finden sich in der Literatur dank des Interesses, das diese Verbindungen als Modellsubstanzen für die Proteine besitzen, eine Reihe von Arbeiten[2]. Die analytischen Methoden, welche bei diesen Untersuchungen durchweg angewendet wurden, die Formoltritration nach SÖRENSEN, die manometrische Kohlensäure- oder Stickstoffbestimmung, die Dinitrophenylmethode oder das colorimetrische Verfahren nach MOORE, ermöglichen die quantitative Erfassung bestimmter funktioneller Gruppen und damit der Summe aber nicht die Erfassung des individuellen Anteils ihrer

Träger. Auf diese Weise kann man im allgemeinen nur etwas über den Gesamtverlauf der Spaltung erfahren. Aussagen über die Kinetik von Simultanreaktionen sind nicht möglich.

Dieser Sachverhalt soll an einem Beispiel illustriert werden. Nach dem Schema



treten bei der Spaltung eines Tripeptids A—B—C sechs Hydrolyseprodukte auf: Die drei Aminosäuren A, B und C, die beiden Dipeptide B—C und A—B sowie noch unverbrauchtes Tripeptid A—B—C.

Aus den Zeitgesetzen für den Zerfall eines Tripeptids

$$[ABC] = [ABC]_0 \, e^{-(k_1' + k_1)t},$$

$$[AB] = [ABC]_0 \frac{k_1'}{k_2' - (k_1' + k_1)} \left\{ e^{-(k_1' + k_1)t} - e^{-k_2' t} \right\},$$

$$[BC] = [ABC]_0 \frac{k_1}{k_2 - (k_1' + k_1)} \left\{ e^{-(k_1' + k_1)t} - e^{-k_2 t} \right\},$$

mit $[ABC]_0 = [ABC]$ für $t = 0$,

die hier unter Annahme einer Reaktion erster Ordnung abgeleitet wurden, geht hervor, daß für die Ermittlung der kinetischen Daten k_1 und k_1' der beiden Peptidbindungen im Tripeptid sowie von k_2 und k_2' der Peptidbindungen in den beiden Dipeptiden die Bestimmung der Konzentrationen einzelner, wenn auch nicht aller Hydrolyseprodukte als Funktion der Zeit notwendig ist.

Nach den Gesetzen der Stöchiometrie sind die Konzentrationen der im Falle eines Tripeptids sechs Hydrolyseprodukte nicht unabhängig voneinander, sondern es gelten die folgenden direkt einzusehenden Beziehungen:

$$\begin{aligned}[ABC]_0 &= [ABC] + [AB] + [A] \\ &= [ABC] + [AB] + [BC] + [B] \\ &= [ABC] + [BC] + [C].\end{aligned}$$

Daraus ergibt sich, daß bei der Aufnahme der Kinetik der Hydrolyse eines Tripeptids die Konzentrationen mindestens dreier Hydrolyseprodukte als Funktion der Zeit gemessen werden müssen. Daß die genaue quantitative Bestimmung dreier, nebeneinander vorliegender Peptidbausteine nach den genannten Verfahren nicht möglich ist, liegt auf der Hand.

Da andere spezifische und ausreichend genaue Bestimmungsmethoden für die einzelnen Aminosäuren und Peptide nicht zur Verfügung stehen, ist demnach vor der Bestimmung eine Trennung der Hydrolyseprodukte eines höheren Peptids unumgänglich, falls man an den kinetischen Konstanten einzelner Peptidbindungen interessiert ist.

Von den zur Auswahl vorliegenden Trennungs- und Bestimmungsmethoden für Peptidbausteine sind für kinetische Untersuchungen diejenigen Arbeitsweisen brauchbar, die eine quantitative Analyse ermöglichen, ohne daß sich das Stadium ändert, in dem sich die Hydrolyse befindet.

Diese Forderung wird unserer Auffassung nach optimal erfüllt, wenn man die Hochspannungs-Zonenelektrophorese zur Trennung und die Radioaktivität markierter Peptide zur quantitativen Bestimmung heranzieht. Selbstverständlich wird man sich in besonderen Fällen auch anderer Methoden bedienen.

Der Vorteil in der Anwendung der Hochspannungs-Zonenelektrophorese liegt darin, daß die Trennung rasch bei tiefer Temperatur in flüchtigen Pufferlösungen mit geringer Ionenstärke, aber auch bei Anwesenheit von Elektrolyten ausgeführt werden kann. Spezifisch katalytische Einflüsse auf die Spaltung von Peptidbindungen sind kaum wirksam. Überdies gestattet die Elektrophorese in vielen Fällen den direkten Nachweis der für den Kinetiker wichtigen Übergangs- und Nebenverbindungen und in gewissem Umfang auch deren Strukturermittlung; man sollte jeden kinetischen Versuch elektrophoretisch oder chromatographisch kontrollieren.

Die Markierung der Peptide vor ihrer Hydrolyse bringt außer der Tatsache, daß damit die Aufrechterhaltung des Hydrolysestadiums während der Analyse weitgehend gewährleistet ist, den Vorteil einer weiteren effektiven Trennmöglichkeit und darüber hinaus die Möglichkeit zur quantitativen Bestimmung von zunächst unbekannten Verbindungen.

Experimentelles

Wir stellten eine Reihe geeignet ^{14}C-markierter Peptide angemessener spezifischer Aktivität dar, hydrolysierten diese unter verschiedenen Versuchsbedingungen, präparierten einen Teil der Hydrolysate durch Gefriertrocknung für die Trennung, schieden die Hydrolyseprodukte durch Zonen-Elektrophorese bzw. Papierchromatographie voneinander

und bestimmten die Mengen der isolierten Substanzen auf Grund ihrer Radioaktivität.

Die Synthese der mit ^{14}C zu markierenden Peptide wurde zunächst mit inaktivem Material ausgeführt. Dies geschah nicht nur, um eine gewisse Kontrolle über die präparative Arbeitsweise zu gewinnen, sondern auch um die Peptide im Hinblick auf ihre elektrophoretische und chromatographische Trennbarkeit richtig zu indizieren.

Es sei dies an einem einfachen Beispiel erläutert (Abb. 1): Aus dem Chromatogramm der Spaltprodukte, die bei der neutralen Hydrolyse des Alanylserins auftreten, erkennt man, daß die Zone des Alanins leicht von der gemeinsamen Zone des Serins und des Alanylserins getrennt werden kann. In diesem Fall ist eine Markierung des Alanins im Alanylserin notwendig und hinreichend. Falsch wäre eine Markierung des Serins. Aus der Aktivität des Alanins und der Gesamtaktivität, die während einer Versuchsreihe natürlich konstant bleibt, lassen sich die Aktivitäten bzw. die diesen proportionalen Konzentrationen des Serins sowohl wie des Alanylserins mit Hilfe der schon für ein Tripeptid angegebenen stöchiometrischen Beziehungen berechnen.

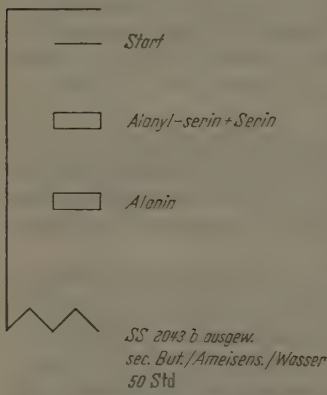


Abb. 1. Chromatogramm des Hydrolysats von Alanylserin

Die spezifische Aktivität der Peptide stellten wir so ein, daß wir mit dem zur Verfügung stehenden Meßgerät FH 51 mit dem 2 π-Zählrohr FH 512 die geringste zur Auszählung kommende Peptid- bzw. Aminosäuremenge noch bequem, d.h. mit über 100 Impulsen je Minute messen konnten. Diese geringste zur Auszählung kommende Menge ergibt sich aus der Kapazität der Trennmedien und aus der Forderung, daß die Strahlungsselbstabsorption in der größten zur Auszählung kommenden Menge noch nicht ins Gewicht fällt, d.h. daß die Flächendichte des Präparats den Wert von etwa 0,15 mg/cm² mit einem noch zu akzeptierenden Aktivitätsverlust von 2% nicht überschreitet. Wir stellten die spezifische Aktivität auf etwa 1,5 mC je Mol ein.

Die Synthese der ^{14}C-markierten Peptide aus den aliphatischen Aminosäuren gelang in guten Ausbeuten nach dem Wielandschen Anhydridverfahren[5]. Peptide des Typus Serin-X stellten wir in ebenfalls guten Ausbeuten durch Kondensation mit N, N'-Dicyclohexylcarbodiimid nach Sheehan dar[4]. Zur Maskierung der Amino- und Carboxylgruppe verwendeten wir durchweg den Carbobenzoxy-[1] bzw. Benzylrest.

Die analysenreinen, elektrophoretisch und chromatographisch einheitlichen Peptide hydrolysierten wir unter verschiedenen Bedingungen. Die Hydrolysate mußten in den meisten Fällen vor ihrer elektrophoretischen bzw. chromatographischen Trennung von überschüssigem Lösungsmittel und überschüssiger Säure befreit werden. Wie demnächst an anderer Stelle näher ausgeführt werden wird, ist die Trocknung salzsaurer Lösungen nach ihrem Einfrieren in flüssiger Luft durch Abziehen der flüchtigen Substanzen im Hochvakuum durchaus nicht so schonend, wie man eigentlich erwarten sollte. Serinpeptide z. B. erleiden unter diesen Bedingungen strukturelle Veränderungen. Leider lassen sich die praktisch realisierbaren Bedingungen für eine tatsächliche Gefriertrocknung nicht voraussagen, da einerseits über die Kinetik der Phasenbildung in Mehrkomponentensystemen, wie sie bei der Gefriertrocknung immer vorliegen, wenig bekannt ist und andererseits die eutektischen Temperaturen solcher Systeme derart tief liegen, daß eine Gefriertrocknung unterhalb der eutektischen Temperatur zu lange dauern würde.

Die Trennung der Hydrolysate nahmen wir auf dem Hochspannungspherographen* nach WIELAND und PFLEIDERER[6] in den von MICHL[3] angegebenen flüchtigen Pyridin-Essigsäure-Puffern auf ausgewaschenen Papieren als Träger vor. DL-Alanyl-DL-serin und DL-Alanyl-DL-alanin spalteten unter den beschriebenen Versuchsbedingungen in ihre Diastereomerenpaare auf. Zur Orientierung seien die relativen apparenten elektrophoretischen Beweglichkeiten v_i einiger als Kationen gewanderter Ampholyte angegeben (Tabelle).

Tabelle

Ampholyt	v_i bei p_H 3.2
DL-Seryl-glycyl-DL-alanin	7,2
Glycyl-DL-alanyl-DL-serin	6,6
Glycyl-DL-alanin	8,0
DL-Alanyl-DL-serin	6,1
	7,1
Glycyl-DL-serin	7,0
DL-Seryl-glycin	7,4
O-DL-Alanyl-DL-serin	14,0
Glycin	5,0
Alanin	4,6
Serin	4,0

Die Maßzahlen für die relativen apparenten Beweglichkeiten v_i sind die Abstände der Zonen vom Start.

Der Trenneffekt der Elektrophorese beruht unter den geschilderten Bedingungen bei den untersuchten Aminosäuren und Peptiden im wesentlichen auf den verschiedenen p_K-Werten ihrer Carboxylgruppen und nicht auf den Unterschieden ihrer Ionenbeweglichkeiten u_i ($v_i = \alpha \cdot u_i$, wobei α der Dissoziationsgrad der Carboxylgruppe ist); eine Ausnahme macht das 2fach positiv geladene O-Peptid.

Für die Isolierung von insgesamt 10^{-5} Mol der zu untersuchenden Aminosäuren und Peptide auf dem Papier MN 2214 von Macherey und Nagel, Düren, benutzten wir ein Gemisch von 7 ml Pyridin, 100 ml Eisessig und 893 ml Wasser, das bei geringer elektrischer Leitfähigkeit und ausreichender Pufferkapazität einen p_H-Wert von 3,2 besitzt. Der Benetzungsgrad des Papiers, d.h. das Verhältnis des Puffergewichtes zu dem Gewicht des an der Luft getrockneten Papiers, betrug 1,1—1,2.

* Geliefert von der Fa. Hormuth & Vetter, Heidelberg.

Bei einer Feldstärke von 50—60 V/cm und einer Temperatur von 0 bis —5° C in den Kühlkammern stellte sich bei Anwendung dieses Puffers eine Stromstärke von 50—80 Milliamp. ein. Die Trennung dauerte je nach Hydrolysat 1—2 Std.

Nach vollzogener Trennung wurden die Pherogramme in einem kräftigen Luftstrom bei 40° C getrocknet. Zur Entwicklung der Zonen zogen wir 2 dünne Striche mit butanolischer 0,2%iger Ninhydrinlösung in Laufrichtung über das Papier und erhitzten die Pherogramme anschließend 10 min auf 105° C. Die Zonen waren dann an ihrer teilweisen Färbung und an ihrer Fluorescenz unter der UV-Lampe zu erkennen; auf diese Weise ließen sich auch die Zonen der Spaltprodukte geringer Konzentration lokalisieren, da wir die Hydrolyseansätze vor ihrer Gefriertrocknung mit kleinen Mengen solcher inaktiver Peptidbausteine versetzten, die im Hydrolysat in geringer Konzentration vorhanden waren. Eine vollständige Entwicklung der Pherogramme war bei quantitativen Untersuchungen nicht möglich, da bei der Ninhydrinreaktion der radioaktive Carboxylkohlenstoff als CO_2 frei wird.

Bei der chromatographischen Isolierung der Hydrolyseprodukte nach der absteigenden Methode auf dem ausgewaschenen Papier 2043b von Schl. & Sch. benutzten wir in den meisten Fällen das von WIELAND empfohlene Gemisch von sek. Butanol, Ameisensäure und Wasser (750:133:117) als Lösungsmittel. Die Chromatogramme wurden wie die Pherogramme weiterverarbeitet.

Die Hydrochloride, die bei der Gefriertrocknung der salzsauren Hydrolysatlösungen des Valyl-glycyl-alanins anfielen, neutralisierten wir vor ihrer Chromatographie mit einer äquivalenten Menge $NaHCO_3$-Lösung und setzten dem oben angegebenen Chromatographielösungsmittel noch 0,5 Teile Pyridin zu. N-Chloracetylaminosäuren wurden mit Äthanol-Wasser-konz. Ammoniak im Verhältnis 80:16:4 chromatographiert.

Zur quantitativen Bestimmung der getrennten Hydrolyseprodukte mußten diese aus dem Papier eluiert werden, da wegen der geringen Härte der β-Strahlung des ^{14}C und der nicht gleichmäßigen Papierdicke eine genaue Analyse auf dem Papier nicht möglich ist.

Die ausgeschnittenen Zonen eluierten wir nach Art der absteigenden Chromatographie mit bidest. Wasser und fingen die Eluate in Aluminiumschälchen oder galvanisch mit Au, Pd, Ag, Rh veredelten V2A-Schälchen auf, die in den Probenwechsler des Zählgerätes paßten. Der Gebrauch der veredelten V2A-Schälchen hatte den Vorteil, daß auch nach mehrmaligem Eindampfen eines Präparates keine Aktivitätsverluste nachzuweisen waren. Die mit etwa 1 μg Netzmittel je Schälchen versetzten Lösungen dampften wir in einem Luftstrom langsam unter der IR-Lampe ein und zählten die Proben in dem Methandurchflußzähler FH 51 mit dem 2π-Zählrohr FH 512 der Fa. Frieseke & Hoepfner, Erlangen-Bruck, aus, wobei die Meßbedingungen, d.h. die Ansprechwahrscheinlichkeit des Detektors, der Geometriefaktor, der Absorptions- und der Streufaktor, in einer Versuchsreihe natürlich konstant gehalten wurden.

Die Aktivitätsverluste bei der Trennung und Bestimmung der Peptidbausteine nach dem geschilderten Verfahren betrugen etwa 5%. Diese Aktivitätsabnahme beruht nicht nur auf dem Verlust an radioaktiven Peptiden bzw. Aminosäuren durch Adsorption am Papier und am Glas und dergleichen, sondern auch auf dem Einfluß von nicht zu eliminieren-

den Verunreinigungen im Papier und im Puffer, die beim Eluieren mit den Peptiden und Aminosäuren aus dem Papier herausgewaschen wurden. Die Substanzverluste sind deshalb sicher geringer als 5%. Da die Gesamtaktivität der verschiedenen Hydrolyseansätze innerhalb einer Versuchsreihe ceteris paribus konstant blieb, sind bei kinetischen Untersuchungen diese geringen Substanzverluste ohne Belang. Die Genauigkeit der quantitativen Bestimmung der radioaktiven Peptidbausteine betrug im Mittel 3%.

Zusammenfassung

Nach Darlegung der analytischen Probleme wird die quantitative Analyse von bei kinetischen Untersuchungen anfallenden Peptidhydrolysaten mit Hilfe von Radiokohlenstoff, der Hochspannungs-Zonenelektrophorese und der Papierchromatographie beschrieben. Auf die Komplikationen bei der Gefriertrocknung salzsaurer Lösungen wird hingewiesen.

Literatur

[1] Bergmann, M., u. L. Zervas: Ber. dtsch. chem. Ges. **65**, 1192 (1932). — [2] Heyns, K., H. F. Grützmacher u. W. Walter: Liebigs Ann. Chem. **609**, 224 (1957); dort weitere Literatur. — [3] Michl, H.: Mh. Chem. **82**, 489 (1951); Chromatogr. Reviews **1**, 11 (1959). — [4] Sheehan, J. C., and G. P. Hess: J. Amer. chem. Soc. **77**, 1067 (1955). — [5] Wieland, Th., u. H. Bernhard: Liebigs Ann. Chem. **572**, 190 (1951). — [6] Wieland, Th., u. G. Pfleiderer: Angew. Chem. **67**, 257 (1955); vgl. diese Z. **149**, 125 (1956).

Prof. Dr. H. Hartmann, Institut für physikalische Chemie der Universität, Frankfurt a. M., Robert Mayer-Str. 11

Physiolog.-chemisches Institut der Universität Würzburg

Spaltung von Dinitrophenyl-aminosäuren

Von

H. Fasold und F. Turba

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 28. Oktober 1960)

Bei der Endgruppenbestimmung von Proteinen nach der Methode von Sanger[4] fallen die am Aminoende stehenden Aminosäuren als Dinitrophenylderivate (DNP-Derivate) an. Im allgemeinen lassen sie sich nach der zweidimensionalen Papierchromatographie nach Levy[2] gut identifizieren, wenn auch die Leistungsfähigkeit der papierchromatographischen Trennung *freier* Aminosäuren bei weitem nicht erreicht wird. Die Flecken können aber selbst bei sorgfältiger Ausarbeitung verschmieren und

Unsicherheiten in der Bestimmung verursachen. Häufig erhält man auch durch Sekundärreaktionen bei der Hydrolyse oder durch Peptide bei erschwerter Säurespaltung Artefakt-Flecken. Die Unterscheidung von Leucin und Isoleucin gelingt nicht.

Gelegentlich führt man auch ein Gemisch von Peptiden in die DNP-Derivate über und trennt mit Hochvolt-Elektrophorese und Chromatographie. Allerdings ist dann nötig, zur weiteren Strukturaufklärung der Fraktionen den DNP-Rest wieder zu entfernen.

Es ist wünschenswert, eine Reaktion zu finden, die es erlaubt, den DNP-Rest unter möglichst vollständigem Erhalten des Grundkörpers von der substituierten Aminogruppe wieder zu entfernen. Eine solche Rückspaltung gelingt durch Erhitzen der DNP-Substanz mit *Ammoniak* im Bombenrohr[1]. Die Ausbeute an Aminosäuren beträgt nach unseren Untersuchungen allerdings höchstens 10—15%. Mit einer Ausbeute von bis 80% können DNP-Aminosäuren ferner nach der Methode von Braunitzer[3] durch langdauerndes Erhitzen mit *konzentrierter Jodwasserstoffsäure* zerlegt werden. Dabei gehen allerdings die Hydroxylgruppen des Serins und Threonins verloren, auch ist das Verfahren nicht anwendbar auf Peptide. Eine Reihe von Aminosäuren ergibt nur geringe Ausbeuten.

Mit einer Ausbeute von bis 89% gelingt nach unseren Versuchen eine solche Spaltung durch *Hydrierung der DNP-Substanz mit Platin und möglichst kurzzeitige Einwirkung von Eisessig auf das Reaktionsprodukt bei Zimmertemperatur*. Wegen der ausgesprochen schonenden Spaltung ist das Verfahren zum Unterschied von allen bisher bekannten Methoden auch anwendbar auf Peptide.

Zur Messung der Ausbeute setzten wir nach der Methode von Sanger synthetisierte DNP-Aminosäuren ein. Zur Befreiung von Dinitrophenol wurden die Reaktionsprodukte nach der Arbeitsweise von Turba u. Gundlach[6] an einer anionotropen Aluminiumoxydsäule adsorbiert, die mit Salzsäure vorbehandelt und mit Wasser neutral gewaschen worden war. Nach Elution des Dinitrophenols mit 2%iger Essigsäure wurde die substituierte Aminosäure mit 1%iger $NaHCO_3$-Lösung ausgewaschen. Die Reinheit der kristallinen Produkte wurde papierchromatographisch geprüft.

Zur Spaltung löst man die DNP-Substanzen in Methanol, das über Magnesiumspänen absolut gemacht ist; zur Ausbeutebestimmung eignet sich eine Konzentration von 2 mg in 50 ml. 0,5 ml der Lösung oder 20 μg werden in einem kleinen Schliffreagensglas mit einer Spatelspitze Platin(IV)-oxyd versetzt und in einer Mikrohydrierapparatur reduziert. Nach 5 min ist die Lösung entfärbt, die Wasserstoffaufnahme nach 15 min beendet. Durch Evakuieren der Apparatur verdampft das Methanol; man läßt Luft einströmen, nimmt sofort das Reagensglas ab und spült mit den nun einpipettierten 0,5 ml Eisessig die Wandung des Gefäßes. Der Eisessig wird sogleich im Rotationsverdampfer abgezogen, er bleibt nicht länger als etwa 4 min mit dem Hydrierungsprodukt in Berührung. Dabei, wie auch beim zweiten Einrotieren mit einem Tropfen Wasser übersteigt die Temperatur des Heizbades 30° C nicht.

Das Hydrierungsprodukt wird mit 0,07 ml Wasser aufgenommen; davon kommen 0,01 ml, entsprechend 2,86 μg der Ausgangssubstanz auf einen Fleck von

0,4 cm ⌀ auf einen 4 cm breiten Papierstreifen. Nun steigt das Lösungsmittelgemisch 10—15 cm auf, wobei der Aminosäurefleck mindestens 1,5 cm wandern soll. Nach dem Trocknen entwickelt man den Fleck durch Eintauchen in eine 0,5%ige Ninhydrinlösung in absolutem Aceton und Erhitzen auf 100° C während 4 min.

Eine Eichkurve mit bekannten Aminosäuremengen wird nach gleicher Chromatographie aufgenommen.

Zur Ausmessung des Aminosäurefleckes diente ein „Analytrol"-Gerät der Firma Beck-

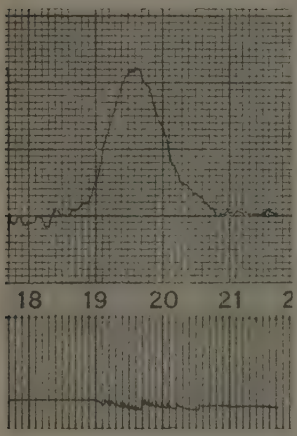


Abb.1

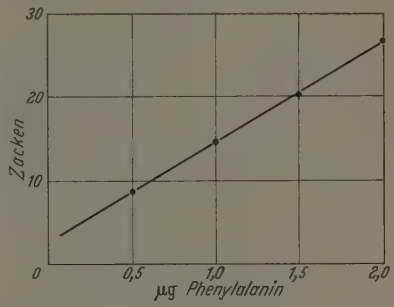


Abb.2

Abb. 1. Absorptionskurve eines Aminosäurefleckes mit ausgezähltem Flächenintegral
Abb. 2. Eichkurve des Phenylalanins

man, das neben der Extinktionskurve mit einem zweiten Schreibarm das Flächenintegral ausgezählt angibt (Abb. 1).

Zur Gewinnung der Eichkurve wurden Mengen zwischen 0,5 und 1,5—2,0 µg reiner Aminosäure eingesetzt, chromatographiert, entwickelt und ausgemessen. Die Kurve war in allen Fällen in diesem Bereich linear und reproduzierbar (Abb. 2).

Die untersuchten Beispiele umfassen alle Gruppen von natürlich vorkommenden Aminosäuren. Die Tabelle ergibt ihre prozentualen Ausbeuten bei der Spaltung.

Bei den Chromatogrammen des Phenylalanins erscheint ein bedeutend schwächerer ninhydrin-positiver Nebenfleck.

Tabelle. *Ausbeuten der Spaltungen von DNP-Aminosäuren als Mittelwerte aus 7—15 Spaltungen*

DNP-Aminosäuren	Ausbeute
Leucin	88,7% (79, 94, 91, 79, 87, 99, 94%) ± 10%
Alanin	81 ± 10%
Asparaginsäure	75,5 ± 10%
Serin	62,6 ± 15%
Phenylalanin	58 ± 6%
ε-Lysin	39 ± 5%
Methioninsulfon	30,8 ± 4%
Cysteinsulfonsäure	76 ± 10%

DNP-Methionin läßt sich als einzige Aminosäure nicht direkt zurückspalten, die Reaktion gelingt erst nach Oxydation des Methionins zum Sulfon.

Die Rückspaltung eines DNP-Peptides, das Hauptziel der vorliegenden Arbeit, erprobten wir am Beispiel des Leucyl-triglycins, dessen Derivat sich leicht kristallisieren läßt. Die Ausbeute betrug hier 46,5%. Bei Chromatographie größerer Mengen erscheint ein sehr schwacher Nebenfleck. Die Reinheit des Ausgangsproduktes Leucyl-triglycin ließ sich durch Papierchromatographie und eine Analyse im automatischen Aminosäureanalysator nach Moore u. Stein[5] prüfen.

Neben Eisessig kann auch eine ebenso kurzzeitige Einwirkung von methanolischer, ätherischer oder wäßriger Salzsäure zur Spaltung dienen. Die Ausbeuten sind dann aber um etwa 5% erniedrigt.

Bei der Hydrierung entstehen aus den beiden Nitrogruppen Aminofunktionen, die Spaltung ergibt demnach als zweites Bruchstück ein wahrscheinlich substituiertes Phenylendiamin. Der Nachweis dieses aromatischen Amins gelingt über seine Diazotierung. Nach Zugabe von Natriumnitritlösung und verdünnter Salzsäure wird überschüssige salpetrige Säure mit Harnstofflösung abgefangen. Die Kupplung mit α-Naphthol in alkalischem Medium bringt einen purpurroten Farbstoff hervor, dessen Spektrum, gemessen im Essigesterextrakt, ein Absorptionsmaximum bei 510 nm zeigt. Die gleiche Reaktion kann man auch durch Aufsprühen der Reagentien auf das Papierchromatogramm vornehmen. Es ließ sich so zeigen, daß das aromatische Spaltstück, weit vor den untersuchten Aminosäuren, mit der Front des Lösungsmittels lief.

Zusammenfassung

Eine Methode zur Rückspaltung von DNP-Aminosäuren wurde beschrieben. Durch Hydrierung mit Platin und kurzzeitige Einwirkung von Eisessig bei Zimmertemperatur erhält man die zugrunde liegenden Aminosäuren zurück. Die schonenden Bedingungen machen die Anwendung auf Peptide möglich.

Literatur

[1] Glick, D.: Methods of Biochem. Analysis, Intersci. Publ., New York, London 1955, Bd. **2**, S. 375. — [2] Levy, A. L.: Nature (London) **174**, 126 (1954); vgl. diese Z. **147**, 212 (1955). — [3] Liebold, B., u. G. Braunitzer: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **316**, 170 (1959). — [4] Sanger, F.: Biochemic. J. **39**, 508 (1945). — [5] Spackman, D. H., W. H. Stein u. S. Moore: Analyt. Chemistry **30**, 1190 (1958); vgl. diese Z. **167**, 224 (1959). — [6] Turba, F., u. G. Gundlach: Biochem. Z. **326**, 322 (1955).

Prof. Dr. F. Turba, Dr. H. Fasold,
Physiolog.-chemisches Institut der Universität, Würzburg, Koellikerstr. 2

Verkaufsgemeinschaft Deutscher Kaliwerke G.m.b.H.,
Landwirtschaftliche Forschungsanstalt Büntehof

Über die Hydrolyse der Peptidbindung

Von
A. Niemann

(Eingegangen am 2. November 1960)

Die Trennung und Bestimmung der in Pflanzensäften vorkommenden freien Aminosäuren durch Papierchromatographie oder Papierelektrophorese wird häufig durch die Gegenwart von gelösten Kohlenhydraten oder Salzen gestört. Seitdem diese Verfahren in Gebrauch sind, werden auch Methoden zur Abtrennung solcher unerwünschter Substanzen beschrieben. In den letzten Jahren gewinnt die Verwendung von Ionenaustauschern ständig an Bedeutung. Soweit Kationenaustauscher verwendet werden, handelt es sich um eine vereinfachte Durchführung der von Stein u. Moore entwickelten Methode zur Trennung der Aminosäuren aus Proteinhydrolysaten an Kunstharzaustauschern. Ein Unterschied zwischen der Reinigung von Säften und jener eleganten Methode ist besonders hervorzuheben. Bei der Bausteinanalyse von Proteinen geht der Trennung die Hydrolyse mit starker Mineralsäure voraus. Bei der Reinigung von Pflanzensäften muß jedoch eine Vorbehandlung, die empfindliche Substanzen verändern könnte, möglichst vermieden werden.

Im Rahmen unserer Untersuchungen über den Reifezustand von Zuckerrüben war es erforderlich, vor allem den Glutamingehalt von Rüben- und Blattsäften möglichst genau zu bestimmen. Diese Säfte weisen ein recht ungünstiges Verhältnis zwischen gelösten Kohlenhydraten und freien Aminosäuren auf. Nach verschiedenen Versuchen zur Trennung dieser Gruppen erschien die Anwendung des Kationenaustauschers Lewatit S 100 als die günstigste Methode. Jedoch waren seinerzeit in der Literatur noch keine eindeutigen Angaben darüber zu finden, ob Glutamin und Asparagin an solchen Austauschern unter Umständen gespalten werden. Plaisted[2] (1958) verneinte dies, Thompson[4] (1959) fand eine geringe Spaltung des Glutamins an Dowex 50 (keine Zeitangabe). Eigene Versuche mit Lewatit S 100 und Dowex 50 ergaben bei Zimmertemperatur innerhalb von 4 Std keine Spaltung, so daß wir nun ein Arbeitsmethode für die Trennung und Anreicherung der freien Aminosäuren und Amide aus Zuckerrübensäften entwickeln konnten.

Die Säfte werden durch Äthylalkohol enteiweißt. Der Austauscher befindet sich in einer Säule von etwa 30 cm Länge und 7 mm ⌀ und wird durch 2 n Salzsäure mit Wasserstoffionen beladen. Anschließend wird er durch Wasser bis zur Neutralität des Auslaufs gespült und dann das Wasser durch 80%igen Alkohol ersetzt.

Innerhalb von 5 min läßt man die alkoholischen Säfte langsam in die Säule einsickern. Dann werden die Kohlenhydrate durch Spülung mit etwa 70 ml Wasser aus der Säule entfernt und danach die Aminosäuren mit 2 n Ammoniak eluiert. Die Eluate werden sogleich im Vakuum unter Schütteln getrocknet. Nach Aufnehmen der Rückstände im Wasser werden die Aminosäuren durch Papierelektrophorese getrennt.

Wir prüften auch, wieweit bei höherer Temperatur eine Reaktion zwischen Austauscher und den absorbierten Aminosäuren stattfinden könnte. Zu diesem Zweck wurden die Säulen mit einem Kühlmantel, wie beim Liebig-Kühler, umgeben, so daß mit Hilfe eines Umlaufthermostaten eine genaue Temperierung erzielt werden konnte. Bei Temperaturen über 30° C konnten wir nach 4 Std eine geringe Spaltung von Glutamin und Asparagin nachweisen. Bei 70° C waren beide Amide bereits nach 2 Std vollständig in Glutaminsäure und Asparaginsäure hydrolysiert. Im Vergleich hierzu erforderte die vollständige Hydrolyse der Amide mit 2 n Salzsäure im geschlossenen Rohr innerhalb von 2 Std eine Temperatur von mindestens 95° C oder bei tieferer Temperatur eine höhere Säurekonzentration. Letztere ist nach Pucher[3] (1940) insbesondere beim Glutamin für die Aufspaltung der zwischendurch gebildeten Pyrrolidoncarbonsäure erforderlich. Im Verlauf der Hydrolyse am Austauscher war unter Berücksichtigung der Genauigkeit der Aminosäurebestimmung mit Ninhydrin keine Pyrrolidoncarbonsäure festzustellen. Bei der Hydrolyse mit Salzsäure im geschlossenen Rohr war sie jedoch deutlich nachzuweisen. Wir ermittelten sie aus der Differenz zwischen dem ursprünglichen Glutamingehalt und der Summe Glutamin + Glutaminsäure nach der Reaktion. Vergleicht man den Verlauf und das Ausmaß der Amidspaltung nach den zwei genannten Methoden, dann kommt dem neutral gewaschenen Austauscher bei 70° C die hydrolytische Wirkung einer 4—5 n Salzsäure zu. Für die Praxis bietet die Austauschermethode den Vorteil, die Hydrolyse der Amide bei tieferer Temperatur ausführen zu können. Außerdem fällt das Abdampfen der überschüssigen Salzsäure mit der dabei auftretenden Säureanreicherung fort.

Orientierende Versuche mit den Dipeptiden Glycylglycin, Glycylleucin und Leucylglycin ließen die starke hydrolytische Wirkung des Austauschers ebenfalls erkennen. Hirohata u. Mitarb.[1]. (1953) stellten die vollständige Spaltung der genannten Peptide bei 100° C in 1 n Salzsäure nach 4, 16 bzw. 28 Std fest, also im Verhältnis 1 : 4 : 7. Die Hydrolyse am Austauscher ergab dagegen ein Verhältnis von etwa 1 : 2 : 2,5 bei 70° C, wobei Glycylglycin nach 4 Std zu etwa 65% gespalten war. Auch bei Diglycylglycin ergaben sich Unterschiede zwischen Salzsäure- und Austauscherspaltung, jedoch ermöglichte die chromatographische Trennung nur eine Abschätzung der einzelnen Komponenten.

Die Beeinflussung der Peptidbindung am Austauscher wird auch durch Versuche anderer Autoren gestützt, in denen Proteine in Gegen-

wart von Kationenaustauschern schon durch sehr verdünnte Mineralsäuren viel schneller gespalten werden als ohne Austauscher.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß mit Wasserstoffionen beladene, neutral gewaschene Kationenaustauscher eine starke hydrolytische Wirkung auf Säureamide und einfache Peptide haben, wobei die Festigkeit der Peptidbindung in unterschiedlicher Weise beeinflußt wird.

Literatur

[1] Hirohata, R., Y. Kanda, M. Nakamura, N. Izumiya, A. Nagamatsu, T. Ono, S. Fujii u. M. Kimitsuki: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **295**, 368 (1953). — [2] Plaisted, Ph. H.: Contr. Boyce Thompson Inst. **19**, 231 (1958). — [3] Pucher, G. W., u. H. B. Vickery: Ind. Engng. Chem. anal. Edit. **12**, 27 (1940); vgl. diese Z. **123**, 79 (1942). — [4] Thompson, J. F., C. J. Morris u. R. K. Gering: Analyt. Chemistry **31**, 1028 (1959); vgl. diese Z. **175**, 224 (1960).

Dr. A. Niemann, Forschungsanstalt Büntehof, Hannover, Bünteweg 8

Institut für Organ. Chemie der Technischen Hochschule Darmstadt

Anwendung der Chromatographie zur Strukturaufklärung von Oligonucleotiden

Von
F. Cramer

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 27. Oktober 1960)

1. Struktur und Bedeutung der Nucleinsäuren

Die Struktur der Nucleinsäuren ist durch die Arbeiten zahlreicher chemischer und biochemischer Forschungsgruppen aufgeklärt worden[1,2]. Nucleinsäuren sind im Prinzip Polyester der Phosphorsäure mit Ribosiden. (Abb. 1). Das Molgewicht dieser Verbindungen ist sehr hoch. Mit dem Zucker sind β-glykosidisch vier verschiedene Basen verbunden: Adenin, Uracil bzw. Thymin, Guanin und Cytosin. Im Makromolekül ist die Sequenz Phosphat-Zucker-Phosphat- usw. unabänderlich, die Reihenfolge der angehängten Basen kann dagegen beliebig permutiert werden. Auf diese Weise ergibt sich eine Unzahl von verschiedenen möglichen Nucleinsäuren, deren Trennung nahezu hoffnungslos erscheint. Nun hat es mit der Reihenfolge der Basen seine besondere, geradezu aufregende Bewandtnis. Die Nucleinsäuren sind Träger der genetischen Information — in den Chromosomen die Desoxyribonucleinsäure, in Viren die Ribonucleinsäure —, und in der Sequenz der Basen sind die Erbeigenschaften kodifiziert[5,6]. Ich erwähne dies, um nur anzudeuten, wie interessant und wichtig die Fraktionierung von Poly- oder Oligonucleotiden mit bestimmten Sequenzen ist. Ich will mich hier beschränken auf die chromatographische Trennung von Oligonucleotiden, d. h. von Oligomeren mit bis zu 10 Bausteinen.

2. Chromatographie von Nucleotiden

Bei der Chromatographie der Nucleotide selbst, also der Monomeren, will ich nicht länger verweilen; hier verwendet man gut ausgearbeitete Verfahren. In der *Papierchromatographie* benützt man eine ganze Anzahl von Lösungsmitteln, zum Teil auf mit Ammoniumsulfat getränktem Papier. Die Verbindungen werden erkannt an ihrer UV-Absorption bei 257 nm, die Flecken können aus dem Chromatogramm ausgeschnitten und eluiert werden; wegen der hohen Extinktionen der Basen ($\varepsilon \sim 10^4$) ist eine quantitative Bestimmung aus dem gewöhnlichen Papierchromato-

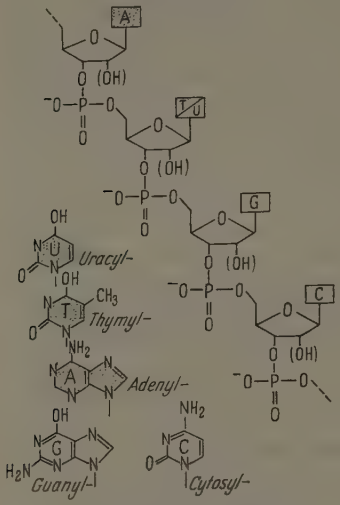


Abb. 1. Struktur der Nucleinsäure

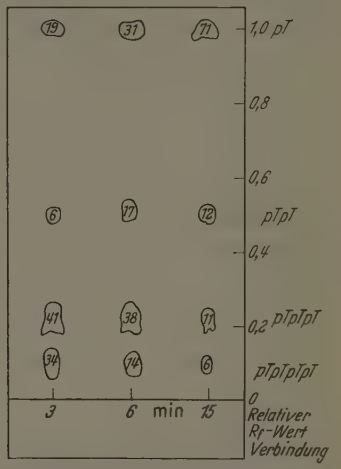


Abb. 2. Zeitlicher Verlauf der enzymatischen Hydrolyse von Polythymidylsäure mit Schlangengiftdiesterase (nach[8])

gramm möglich. Phosphat läßt sich auch mit Perchlorsäure-Ammoniummolybdat nachweisen.

Sehr brauchbar ist ebenfalls die Ionenaustauscherchromatographie an Dowex-2.

3. Papierchromatopraphie von Oligonucleotiden

In den letzten 2—3 Jahren hat man begonnen, die chemische und biologische Synthese von Polynucleotiden zu studieren und bedient sich dabei einer Kombination papierchromatographischer und enzymatischer Methoden. Zunächst lassen sich die Oligonucleotide im Chromatogramm vortrennen. Wohl am besten trennt das Gemisch Isobuttersäure-1 n-Ammoniak-0,2 m-ÄDTA (100:60:0,89), worin das Hexamere, das Pentamere und das Tetramere noch leicht unterschieden werden können.

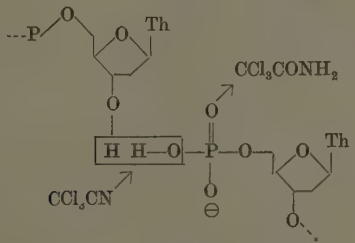
Geeignet hierfür ist auch Isopropanol-Ammoniak-Essigsäure-Wasser (4:1:2:2)[11], in dem die Pentathymidylsäure immerhin noch einen R_f-Wert von 0,21 hat. Die Trennung ist also grundsätzlich möglich bis etwa zum Dekameren, darüberhinaus sind wir bis jetzt noch ziemlich hilflos.

Über die eigentliche Trennung hinaus kann man aber auf dem Papierchromatogramm eine ganze Konstitutionsaufklärung der Oligonucleotide durchführen, indem man die Flecke eluiert, bestimmte Enzyme darauf einwirken läßt und dann die enzymatischen Reaktionen quantitativ verfolgt[4].

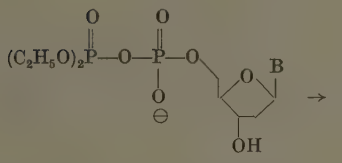
Alkalische Hydrolyse liefert Nucleosid-2- und -3-phosphate, Schlangengiftphosphodiesterase liefert Nucleosid-5-phosphate[8], Milzphosphodiesterase gibt Nucleosid-3-phosphate.

Alle diese Verbindungen kann man wiederum chromatographisch trennen bzw. ihr Erscheinen im Reaktionsverlauf verfolgen und darauf Konstitutionsbeweise für die Oligonucleotide gründen (vgl. Abb. 2).

Wir haben begonnen, auf chemisch-präparativem Wege Oligonucleotide darzustellen und zwar auf zweierlei Weise: Mit Trichloracetonitril als Veresterungsreagens[2] [ausgedrückt in Formelbild (1)] und durch Polykondensation von Nucleosid-diphosphat-diestern[3] [Formelbild (2)].



(1)



(2)

Beim Arbeiten im präparativen Maßstab kommt man mit Papierchromatographie nicht mehr aus, man muß dann zu Säulenverfahren übergehen. Nun sind weder reine Papiersäulen noch Ionenaustauscherharze hier brauchbar, dagegen haben sich ausgezeichnet bewährt solche Cellulosepulver, die chemisch modifiziert und mit basischen Gruppen ausgestattet werden.

4. Ionenaustauscherchromatographie von Oligonucleotiden

Man verwendet zwei Sorten derartiger Cellulosen, die DEAE-Cellulose[7] (mit *Diäthylaminoäthan*-gruppen) und die ECTEOLA-Cellulose[1,7], beide Materialien sind inzwischen handelsüblich. Solche Trennungen hat zuerst KHORANA[11] durchgeführt, die erstaunliche Leistungsfähigkeit der Methode zeigt Abb. 3.

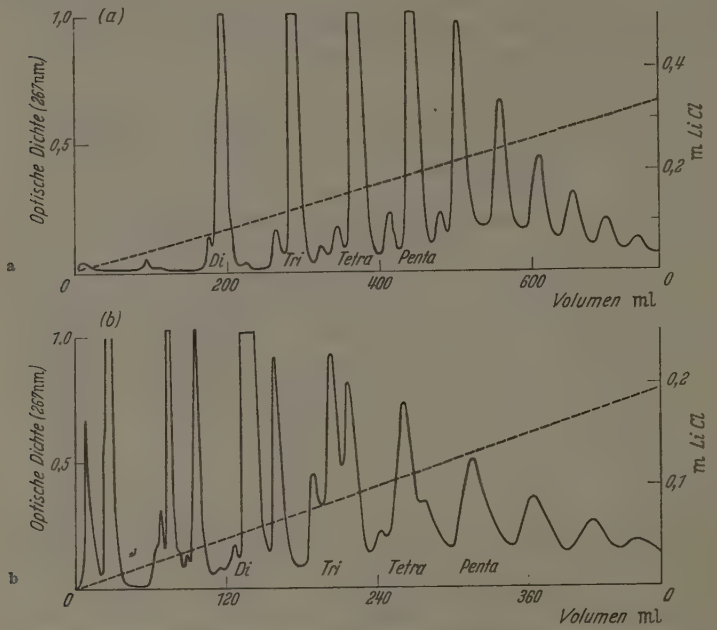


Abb. 3. Trennung von Oligothymidylsäure an DEAE (a) und ECTEOLA (b) (nach KHORANA[11])

Elutionsmittel ist eine Lithiumchloridlösung steigender Konzentration. Bei derartigen Trennungen ist es häufig nachteilig, daß man in den eingedampften Fraktionen große Salzmengen vorliegen hat; das wird vermieden, wenn man mit einem Ammoniumbicarbonat/Ammoniak-Puffer arbeitet. Das Salz kann dann im Hochvakuum absublimiert werden[10] (vgl. Abb. 4).

5. Problem – Ausblick

Das wichtige Gebiet der Trennung und Analyse von Oligonucleotiden erfordert noch gründliche Erschließung. Vor allem gibt es noch keine übersichtlichen und allgemeinen Methoden der Sequenzanalyse, die im Bereich der Peptide von SANGER gefunden wurden. Hier liegt noch eine

wichtige Aufgabe von höchster Aktualität, denn die genetische Information liegt, wie erwähnt, in der Nucleotidsequenz beschlossen. Weiterhin müssen die Trennungsverfahren, die bis jetzt einwandfreie Trennungen nur bis etwa zum Dekameren gestatten, auf die höheren Homologen ausgedehnt werden.

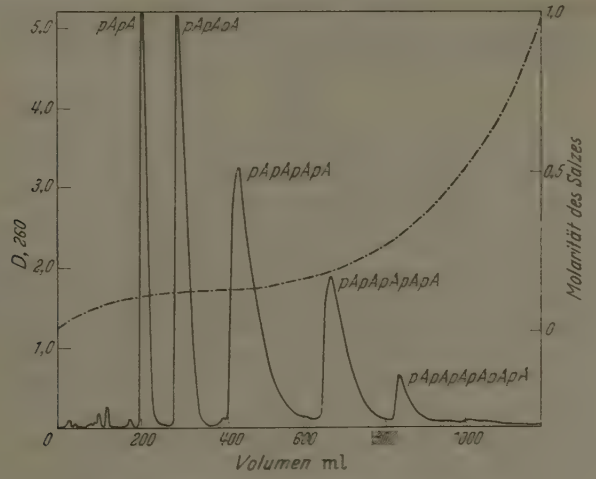


Abb. 4. Trennung von Oligoadenylsäure an DEAE (nach[10])

Literatur

[1] Beudich, A., S. R. Fresco, H. S. Rosenkranz u. S. M. Beiser: J. Amer. chem. Soc. **77**, 3671 (1955). — [2] Cramer, F., u. H.-J. Baldauf: unveröffentlichte Versuche. — [3] Cramer, F., u. R. Wittmann: Angew. Chem. **72**, 628 (1960). — [4] Heppel, L. A., P. J. Ortiz u. S. Ochoa: J. biol. Chemistry **229**, 679 (1957). — [5] Kornberg, A.: Angew. Chem. **72**, 231 (1960). — [6] Ochoa, S.: Angew. Chem. **72**, 225 (1960). — [7] Peterson, E. A., u. H. A. Sober: J. Amer. chem. Soc. **78**, 751 (1956). — [8] Razzell, W. E., u. H. G. Khorana: J. biol. Chemistry **234**, 2114 (1959). — [9] Singer, M., R. J. Hilmoe u. L. A. Heppel: J. biol. Chemistry **235**, 751 (1960). — [10] Staehelin, M., E. A. Peterson u. H. A. Sober: Arch. Biochem. Biophysics **85**, 289 (1959). — [11] Teuer, G. M., H. G. Khorana, R. Markham u. E. H. Pol: J. Amer. chem. Soc. **80**, 6223 (1960). — [12] Todd, A. R., Zusammenfassung: Angew. Chem. **70**, 527 (1958).

Prof. Dr. F. Cramer, Lehrstuhl II für organische Chemie der Techn. Hochschule, Darmstadt, Schloßgartenstraße 2

VI. Anwendung von Isotopen zur Analyse organischer Verbindungen und zur Aufklärung des Ablaufs organisch-chemischer Reaktionen

Über radiochemische und gaschromatographische Methoden zum Studium der reversiblen Alkoxylierung und Alkylierung berichten K. Kratzl, G. Billek, G. Puschmann, H. Simon, K. Gruber und D. E. Bland[1]. Zum Studium der Biogenese des Angio- und des Gymnospermenlignins wurden ^{14}C markierte Vorstufen aliphatischer Art wie Essigsäuremethyl ^{14}C und D-Glucose-1-^{14}C aber auch am C_3 und C_2 der Seitenkette markierte Cambialsaftglucoside (Coniferin und Syringin sowie C_6-C_1-Körper (^{14}C-Methyl-kreosol) und Carbonyl-^{14}C-Syringaaldehyd, p-Hydroxybenzaldehyd) an Buchen und Fichten appliziert. Um definierte, der C-Folgebestimmung zugängliche Abbauprodukte zu erhalten, wurden folgende Reaktionen des Lignins bzw. Holzes im Mikromaßstab angewendet: Extraktion, Oxydation Sulfitierung und alkalische Hydrolyse sowie Äthanolyse. Zur Aufarbeitung bzw. Trennung der oft komplizierten Gemische kam die Papierchromatographie und vor allem die Dünnschichtchromatographie zum Einsatz. Die Lokalisierungsreaktionen an allen 3 C-Atomen der Seitenkette und an den wichtigsten C-Atomen des aromatischen Kernes werden besprochen, und es wird gezeigt, daß Glucose über den Davis-Sprinsonweg und Coniferin direkt in das Lignin eingebaut werden. Aber auch ein Aufbau der Seitenkette, also C_6-C_1 zu C_6C_3 ist in untergeordnetem Maß zu beobachten. Auch das Methoxyl-C war bei der Glucoseapplikation stark aktiv, so daß das C_1 der Glucose dafür verantwortlich gemacht werden kann. Es konnte eindeutig eine Methoxylierung des aromatischen Kernes (Übergang der Vanillin- in Syringaderivate) sowie auffallenderweise auch eine Entmethoxylierung (bei Zugabe von Syringaderivaten werden aktive Vanillinderivate gebildet) festgestellt. Diese reversible Alkoxylierungsvorgänge scheinen im biogenetischen Mechanismus schon recht früh aufzutreten (Phenylalanin, Phenylbrenztraubensäure?), und ihre Begrenzung ist die Ursache der überraschenden Einfachheit des Lignins der höheren Pflanzen in bezug auf die Substitution des Grundaromaten. Die Alkylierung des Lignins (in vitro) tritt sehr leicht ein (Alkohol bei 150° C ohne Säurezusatz). Der Alkylierungsgrad wurde mit Hilfe der gaschromatographischen Alkoxyltrennung ermittelt. Diese neue Methode läßt sämtliche Alkyle von C_1 bis C_5 schnell und mit überraschender Genauigkeit nebeneinander bestimmen und beruht auf einer Kombination der gaschromatographischen Trennung mit der Alkylhalogenidtitration nach Zeisel-Vieböck. Die Methanolbehandlung des Holzes mit Methyl-^{14}C-Methanol ergab eine in vitro-Alkylierung, die durch mildes Alkali und Säure reversibel gestaltet werden konnte. Die Modellsubstanz, der β-Guajacyläther des Guajacylglycerins, zeigt analoges Verhalten. Damit wurde die Vermutung Adlers, wonach die in vitro-Alkylierung des Lignins an einer Benzylalkoholgruppe stattfindet, bestätigt. Ein Teil des Methanols wird allerdings auch irreversibel eingebaut, was unter Ausbildung einer C-C-Bindung im Lignin geschehen kann.

[1] Organ.-chem. Institut, Universität Wien und Österreichisches Holzforschungsinstitut. (Der Vortrag wurde nicht gehalten.)

Max-Planck-Institut für Chemie (Otto Hahn-Institut), Mainz, und Institut für Kernchemie der Universität Köln, sowie Arbeitsgruppe Radiochemie, Kernforschungsanlage Jülich

Radiogaschromatographische Analyse tritiummarkierter aromatischer Nitro- und Halogenverbindungen bei höheren Temperaturen

Von

H. J. Ache, A. Thiemann* und W. Herr

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 18. November 1960)

Die in den letzten Jahren in allen Zweigen der Naturwissenschaften und der Medizin stark zunehmende Verwendung des Tritiums als Leitisotop hat es mit sich gebracht, daß die bisherigen Arbeitsmethoden, die einen gezielten Einbau des Tritiums in organischen Molekülen anstreben, augenblicklich intensiv studiert und verbessert werden. Nun ist die Herstellung tritiummarkierter Verbindungen nach synthetischen, konventionellen Methoden, wie beispielsweise über die katalytische Absättigung von Doppelbindungen mit Tritiumgas, der Aufbau aus tritiumhaltigen Ausgangsstoffen über katalysierte Austauschreaktionen oder über die Biosynthese in den meisten Fällen sehr mühsam und zeitraubend. Hinzu kommt, daß das Tritium bei solchen Prozessen oft in eine labile Stellung gebracht wird, aus der es unter Umständen leicht ausgetauscht wird, so daß seine Leitisotopen-Tauglichkeit weitgehend in Frage gestellt ist.

Man hat daher frühzeitig versucht, den Weg einer Direktmarkierung zu gehen. Eine solche direkte Markierung einer organischen Verbindung gelingt hauptsächlich auf zwei Wegen. So einmal mit Hilfe eines energiereichen Kernprozesses, beispielsweise $^3H\ (n, p)\ T$ oder $^6Li\ (n, \alpha)\ T$ über den Kernrückstoß[5], oder durch einfache Einwirkung von Tritiumgas auf die zu markierende Substanz. Das zweite Verfahren wurde bekanntlich von Wilzbach[7] zuerst beschrieben. Hier kann durch Zuführung von Energie, d. h. einer „äußeren" Anregung, in Form von γ-Strahlung, elektrischer Energie, Tesla-Entladungen und Mikrowellen oder auch durch UV- und β^--Strahlung die chemische Reaktion beschleunigt und beeinflußt werden[9]. Es ist nun anzunehmen, daß sich alle diese Verfahren im Ergebnis etwas unterscheiden werden, denn dieses wird weitgehend vom Reaktionsmechanismus und folglich von der Größe und Art der Energie-Übertragung vom ^3H auf das organische Molekül abhängen.

* Die vorliegende Arbeit ist ein Teil der Dissertation von A. Thiemann, Köln 1961.

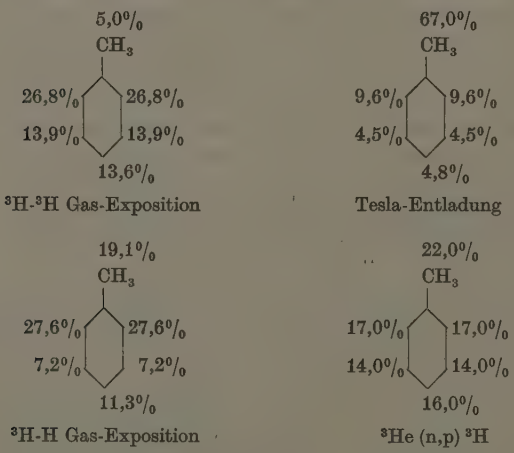
So haben wir es beispielsweise beim Kernrückstoß mit schnell bewegten, hoch energetischen Tritonen zu tun, die auf ihrem Wege eine annähernd statistische Fragmentierung von Molekülen, (d. h. Lösung vom C—C bzw. C—H-Bindungen) bewirken, wobei schließlich über Platzwechselreaktionen oder auch über thermische Reaktionen mit Molekülbruchstücken neue Verbindungen entstehen können.

Beim sogenannten Wilzbach-Verfahren steht als energieliefernde Quelle lediglich die eigene β^--Zerfallsenergie des Tritiums, also ein relativ kleiner Betrag zur Verfügung.

Die seitherigen Untersuchungen auf diesem Gebiet der Tritiummarkierung begnügten sich zumeist damit, die Gesamtaktivität der markierten Substanzen sowie den Teil der ^{3}H-Aktivität, der auf die entstehenden Nebenprodukte entfällt, zu messen. Bis zum heutigen Tag ist dagegen sehr wenig über die Stellung des Tritiums im markierten Molekül bekannt und welchen Einfluß die Darstellungsweise auf die Verteilung hat.

Daher haben wir unsere Aufgabe darin gesehen, die jeweilige Verteilung des Tritiums in einem nach verschiedenen Methoden substituierten Molekül festzustellen und durch Variation der Einführungsbedingungen dem Ziel einer spezifischen Markierung näher zu kommen.

Tabelle. *Verteilung der Tritiumatome im Toluolmolekül*



Für eine solche Untersuchung erscheint uns das Toluolmolekül besonders geeignet. — Wie sich aus der Tabelle ergibt — in der ein Teil unserer Ergebnisse zusammengefaßt ist — wurde eine zu erwartende Abhängigkeit der Stellung des Tritiums von der jeweiligen Darstellungsweise

beobachtet. Wenn es auch keineswegs gelang, das Tritium einheitlich in eine bestimmte Position zu dirigieren, so erkennt man doch, daß sich beispielsweise im Falle der Tesla-Entladung eine deutliche Bevorzugung der Methylgruppe ergibt. Auch in den anderen Fällen läßt sich eine Abweichung von der rein statistischen Verteilung nachweisen.

Eine systematische Untersuchung verlangte nun nach einer analytischen Methode, die die Position des ^3H im Molekül schnell und sicher anzugeben gestattet. Bisher wurde versucht, die Stellung des Tritiums über die Darstellung einer Reihe geeigneter Derivate, wie beispielsweise Benzoesäure, die Dinitrotoluole, para-Nitrobenzoesäure und penta-Bromtoluol zu ermitteln[8]. Dieses Verfahren erweist sich zwar als recht genau, ist aber andererseits sehr mühsam und zeitraubend. — Wir haben daher nach einem anderen Weg gesucht und die radiogaschromatographische Analyse[2] des Toluols und seiner Mononitroderivate (ortho-, meta- und para-Nitrotoluol) geeignet befunden und zur Anwendung gebracht.

Dabei verfährt man wie folgt: Das nach den verschiedenen Methoden ^3H-markierte Toluol wird gaschromatographisch gereinigt und ein Teil, etwa 10%, davon zurückbehalten. Der größere Teil wird in der üblichen Weise mononitriert.

3 g Toluol werden bei 60° C tropfenweise in eine Mischung von 3 g Salpetersäure (D 1,4) und 4 g konz. Schwefelsäure gegeben, die Mischung wird 30 min auf 60° C gehalten und anschließend mit Eiswasser verdünnt. Die Nitrotoluole werden in Äther aufgenommen und über Calciumchlorid getrocknet. Nach dem Abdampfen des Äthers und eines kleinen Restes nicht umgesetzten Toluols wird eine bestimmte Menge des vorher abgenommenen Toluols wieder zugesetzt und die Mischung in der weiter unten beschriebenen Weise radiogaschromatographisch untersucht.

Eine Vorbedingung für diese Art der Analyse ist allerdings, daß bei Mononitrierung des Toluols keine störenden Isotopieeffekte auftreten. Hierzu liegen bereits die Untersuchungen von Melander[4] vor, die an dinitrierten Toluolen gezeigt haben, daß bei der vorsichtigen Nitrierung von tritium- und deuteriumhaltigen Toluol praktisch keine Isotopieeffekte in Erscheinung treten, d. h. $^3H^+$-Ionen verhalten sich beim Austausch gegen NO_2^+ wie H^+-Ionen. Wir haben uns vergewissert, daß dieses Verhalten auch bei Mononitroderivaten zutrifft. Dazu wurde o-t-Toluol durch Umsetzung der Grignard-Verbindung des o-Bromtoluols mit T_2O-haltigem Wasser hergestellt und dieses mononitriert. Die drei im Verhältnis von 60:35:5 ortho:para:meta entstehenden Nitrotoluole enthielten dann die jeweils berechnete ^3H-Aktivität; dasselbe traf auch im Falle der meta-t- und para-t-Toluole zu.

Aus den auf solche Weise ermittelten molaren spezifischen Aktivitäten kann jetzt die Tritiumverteilung im Molekül berechnet werden.

Radioaktivitätsmessung

Für die kontinuierliche Registrierung des Tritiumgehaltes im Gasstrom konnten wir wegen der erforderlichen hohen Temperaturen die bisher gebräuchlichen Zählmethoden leider nicht ohne weiteres über-

nehmen. Ein kontinuierliches, empfindliches Scintillations-Zählverfahren für Tritium, ist vor allem für hochsiedende Substanzen mit großen technischen Schwierigkeiten verbunden und unseres Wissens noch nicht beschrieben worden. Man weiß, daß die laufende Kondensation der aus dem Gaschromatographen austretenden Dämpfe in einer geeigneten Scintillationsflüssigkeit, wie sie beispielsweise von Lowe u. Moore[3] für den Fall von ^{14}C-Messungen beschrieben wurde, für tritiummarkierte Produkte wegen der recht geringen Licht- und Zählausbeute und dem resultierenden hohen Untergrund kaum (oder nur sehr beschränkt) anwendbar ist. Eine andere Möglichkeit, den Nachweis der schwachen β-Strahlung mit Hilfe einer Ionisationskammer durchzuführen, leidet darunter, daß bei den hier erforderlichen hohen Temperaturen von über 200° C (um eine Kondensation und folglich Kontamination zu vermeiden) der Nullwert der Kammer sehr hoch wird*.

Außerdem stellten wir fest, wie das auch Tolbert[6] beobachtete, daß bei Temperaturen um 200° C beim Durchgang von inaktiven Substanzen durch die Ionisationskammer unkontrollierbare Signale vom Elektrometer angezeigt werden. Wahrscheinlich rühren diese Störungen von ionisierten Gasen her, sie können auch kaum durch das Vorschalten einer Ionenfalle unterdrückt werden.

Wir wählten daher einen anderen Weg und benutzten für unsere Messungen ein Gasdurchfluß-Proportionalzählrohr. Wolfgang u. Rowland[10] betrieben ein solches noch bei Temperaturen von 150° C mit einem Gemisch von Argon-Butan bzw. Helium-Methan. Unsere Versuche, diese Zählgasgemische zu verwenden, scheiterten zunächst daran, daß die vorliegenden Nitrokörper beim Durchgang die Zähleigenschaften des Zählgases stark veränderten, so daß an eine kontinuierliche Aktivitätsmessung nicht zu denken war. Andere Zählgasgemische, wie Alkohol-Methan usw. zeigten keine besseren Erfolge. Andererseits war es auch nicht möglich, wegen der relativ geringen spezifischen Aktivitäten, die uns zur Verfügung standen, die aufgegebenen Substanzmengen so stark zu vermindern, daß eine „Vergiftung" des Zählrohres vermieden werden konnte.

Zur Lösung dieses Vergiftungsproblems gingen wir von dem Gedanken aus, dem Zählgas bereits eine genügend große Menge einer chemisch gleichen Verbindung von vornherein zuzusetzen. Damit kann eine merkliche Beeinflussung der Zähleigenschaften durch die zu analysierende Verbindung nicht mehr eintreten. Es ergab sich später, daß es nicht nötig ist, die chemisch gleiche Verbindung dem Zählgas beizumischen, sondern es genügt eine chemisch ähnliche Substanz. Dieser Umstand ist für gaschromatographische Untersuchungen besonders wichtig, da oft

* Die Siedepunkte der Nitroverbindungen liegen etwa zwischen 210—300° C.

mehrere verwandte Verbindungen hintereinander mit dem gleichen Zählgas gemessen werden können.

Eine noch zu klärende Frage war, ob dieses neue Gasgemisch nunmehr auch den Anforderungen, die man normalerweise an ein gutes Zählgas zu stellen gewohnt ist, genügen würde. Unsere diesbezüglichen Prüfungen ergaben ein günstiges Resultat, und wir verwendeten für die ^{3}H-Aktivitätsmessungen von aromatischen Nitroverbindungen stets ein Gemisch folgender Zusammensetzung: 34% Helium, 62% Methan 4% Nitrobenzol (Volumenprozente).

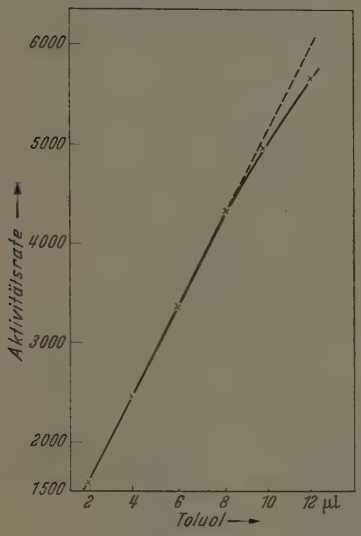


Abb. 1a

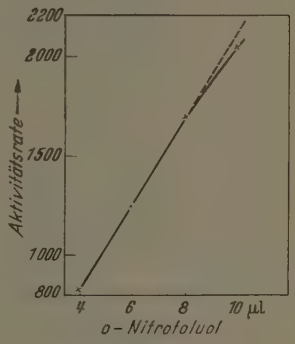


Abb. 1b

Abb. 1a. ^{3}H-Aktivitätsmessung in Abhängigkeit von der aufgegebenen Menge Toluol (Zählgas: Helium-Methan-Nitrobenzol)

Abb. 1b. ^{3}H-Aktivitätsmessung in Abhängigkeit von der aufgegebenen Menge o-Nitrotoluol (Zählgas: Helium-Methan-Nitrobenzol)

Die angegebene Gaszusammensetzung erlaubt es, noch eine Menge bis zu etwa 8 mg Toluol oder Mononitrotoluol durchzusetzen, ohne daß die Radioaktivitätsmessung beeinträchtigt wird. (Abb. 1a und b). Dies ist bedeutungsvoll und wirkt sich günstig aus, wenn die zu chromatographierenden Stoffe von relativ geringer spezifischer Aktivität sind.

Eine weitere Erhöhung der Konzentration kann nur durch einen größeren Nitrobenzolanteil im Zählgas kompensiert werden. Dies bedingt allerdings eine erhebliche Erhöhung der Zählrohrspannung und Verkürzung des Plateaus (Abb. 4).

Das Verfahren, das wir zuerst auf aromatische Nitrokörper anwendeten, haben wir auch auf eine Reihe von anderen Verbindungen ausgedehnt

und gute Resultate erzielt. So wurden auch chlorierte Aromaten durch Verwendung von Chlorbenzol im Zählgasgemisch analysiert. Die Konstruktion des Zählrohres erlaubte noch eine Arbeiten bei Temperaturen bis zu 250° C, dadurch konnten kontinuierliche Aktivitätsmessungen auch noch an recht hochsiedenden Substanzen vorgenommen werden.

In der Abb. 2 wird ein Überblick über die gesamte Apparatur gegeben. Sie besteht aus einem normalen Gaschromatographen (Modell Gasofract der Fa. Dr. Virus KG, Bonn) mit Wärmeleitfähigkeitsdetektor. Am Ausgang ist noch innerhalb des Luftthermostaten das von uns konstruierte

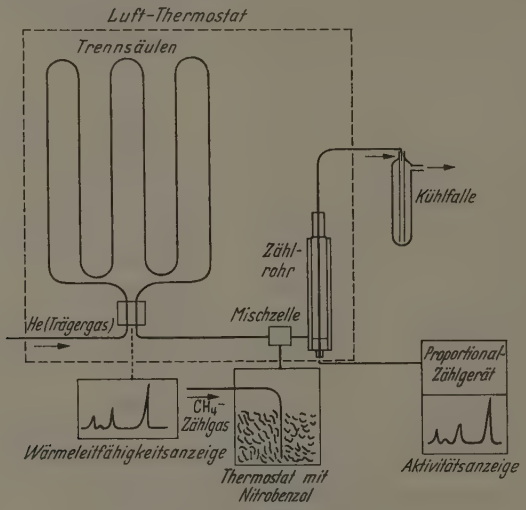


Abb. 2. Überblick über die gesamte Apparatur

Proportionalzählrohr angeschlossen. Der Säulendurchmesser beträgt 8 mm bei einer Länge von 8 m. Für die Trennung der drei Mononitrotoluole wurde als flüssige stationäre Phase 2,4,7-Trinitrofluorenon-9 auf Sterchamol mit Erfolg verwendet.

Die Gaszuführung zum Zählrohr erfolgt einmal über die Kolonneneinheit, durch die das Trägergas (Helium) und die zu analysierenden Substanzen strömen, sowie über einen zweiten Anschluß, durch den ein Gemisch von Methan und Nitrobenzol über eine Vorwärmspirale geleitet wird. Es ist notwendig, den Gasdurchfluß durch Membranventile zu regulieren und mit einem Durchflußmesser zu überwachen. Die Zumischung des Nitrobenzoldampfes erfolgt in der Weise, daß Methan durch ein mit porösem Scherben gefülltes Gefäß, in dem sich Nitrobenzol

befindet, geleitet wird. Es stellt sich bei vorgegebener Temperatur ein bestimmter Sättigungsdampfdruck ein. Beispielsweise hat Nitrobenzol bei 120° C einen Dampfdruck von etwa 50 mm Hg.

Das Zählrohr (Abb. 3) besteht aus einem zylindrischen Edelstahlmantel von 18 mm ⌀ und 45 mm Länge und ist beiderseits mit Teflonscheiben verschlossen, die von Gewinderingen dicht gehalten werden. Der Zähldraht (0,05 mm ⌀ Wolframdraht) ist in der aus der Abbildung ersichtlichen Weise mit Federn an den Teflonscheiben befestigt. Diese besitzen außerdem noch eine Halterung für die Hochspannungszuführung. Sowohl Gaszuleitung wie Gasableitung sind durch „Ermeto" Metallverschraubungen fest mit dem Gaschromatographen verbunden. Die Erdung des Zählrohres erfolgt direkt über diese metallische Verbindung.

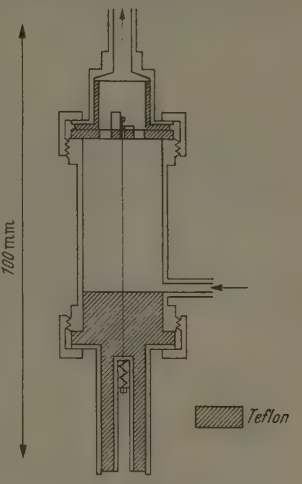


Abb. 3
Gasdurchfluß-Proportionalzählrohr

Mit der oben angegebenen Zählgasmischung erhielten wir bei einer Arbeitstemperatur von 210°C ein etwa 50 Volt betragendes Plateau (von 5% Steigung), das zwar relativ kurz ist, jedoch gut konstant gehalten werden kann (Abb. 4). Auf

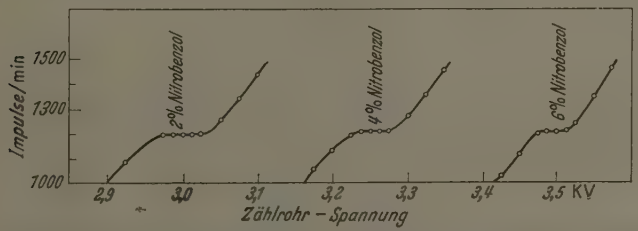


Abb. 4. 210° C-Zählrohr-Plateaukurven der Helium-Methan-Nitrobenzolmischung in Abhängigkeit vom Nitrobenzolgehalt. Helium-Methan Trägergas 1:1,85

Grund der gegebenen Zählrohr-Geometrie läßt sich erreichen[1], daß etwa 90% aller ^{3}H-Zerfälle erfaßt werden. Der Nulleffekt betrug nur etwa 40 Imp./min (bei 210°C Arbeitstemperatur).

Die Empfindlichkeit des Strahlungsnachweises einer radioaktivmarkierten Verbindung, die die chromatographische Säule verlassend, das Durchflußzählrohr durchsetzt, ist ganz allgemein in erster Linie

abhängig von dem Verhältnis zwischen Zählrohrvolumen und dem Gasdurchfluß:

Es gilt beispielsweise

$$N = A\left(\frac{v}{f}\right) \cdot g.$$

N = Zahl der während des Durchgangs einer Substanz im Zählrohr gemessenen Zerfälle.
A = Absolute Aktivität der durchfließenden Substanz.
v = Zählrohrvolumen.
f = Stömungsgeschwindigkeit des Eluiergases.
g = Zählausbeute — Faktor.

Bei der von uns bevorzugten (optimalen) Durchflußgeschwindigkeit des Trägergases von 40 ml Helium/min ist beispielsweise der Nachweis von $10^{-4}\,\mu$ C^3H in Form von tritierten Nitrotoluol noch ohne Schwierigkeiten möglich.

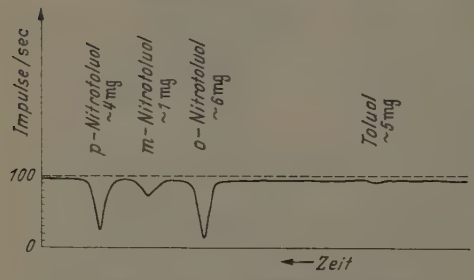


Abb. 5. Beeinflussung der Zählrate beim Durchgang von inaktivem Toluol und Nitrotoluol. (Die Zählrate wurde durch eine äußere Strahlenquelle auf einem Wert von 6000 Imp./min gehalten. Temperatur 210°C). ----- Helium-Methan-Nitrobenzol-Zählgas; — Helium-Methan-Zählgas (ohne Nitrobenzol)

Auch wurde eine Klärung der Frage angestrebt, in welcher Weise eine das Zählrohr durchströmende Fremdsubstanz die Zählrate beeinflußt. Hier zeigte vorerst eine Impulshöhenanalyse mittels Oscillographen, daß die Impulse unter unseren Arbeitsbedingungen normal verstärkt wurden. Unabhängig davon wurde kontrolliert, wiebei Verwendung einer äußeren Strahlenquelle (an Stelle der ^3H-β^--Strahlung) die jeweilig gesetzte Zählrate beim Durchgang vergleichbarer Mengen von inaktiven Substanzen verändert wird.

Es ließ sich einrichten und sicherstellen, daß bei optimaler Zählgaszusammensetzung eine merkliche Veränderung der Zählrate nicht auftrat. Allerdings unter der Voraussetzung, daß die aufgegebenen Mengen der zu trennenden Stoffe (hier die 3 Nitrotoluole), die 10 mg-Grenze nicht überschritten.

Zur besseren Demonstration des Gesagten möchten wir in Abb. 5 ein Radiogaschromatogramm eines inaktiven Gemisches von Toluol und den 3 isomeren Nitrotoluolen wiedergeben.

Hierzu ist zu bemerken, daß beim Fehlen eines Nitrobenzolzusatzes zum Zählgas die durch eine äußere Strahlenquelle erzeugte Zählrate von

etwa 6000 Imp./min beim Durchgang der chromatographisch getrennten Verbindungen, in charakteristischer Weise abfällt. So entstehen gewissermaßen negative „peaks" (durchgezogene Kurve). Die gestrichelte Kurve zeigt die unveränderte Zählrate unter sonst gleichen Versuchsbedingungen, lediglich daß hier nun in Gegenwart von 4% Vol Nitrobenzoldampf gezählt wurde.

In Abb. 6 wird noch das Resultat einer radiogaschromatographischen Analyse des gleichen, jetzt ^{3}H-markierten, Stoffgemisches bei einer Temperatur von 210°C und unter den als günstigst ermittelten Versuchsbedingungen wiedergegeben. Es ist ersichtlich, daß die synchrone Registrierung von Wärmeleitfähigkeit und ^{3}H-Aktivität eine einwandfreie Identifizierung sowie eine Ermittlung der spezifischen Aktivität der getrennten Stoffe erlaubt.

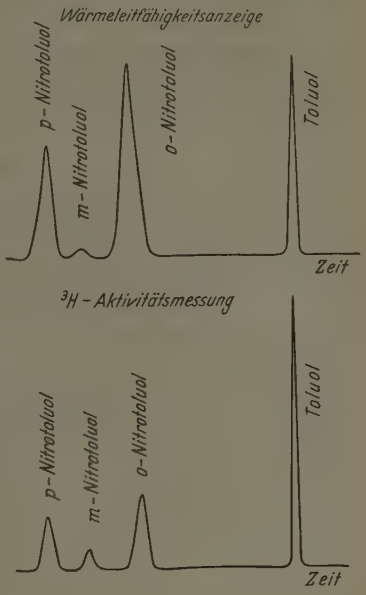


Abb. 6. Radiogaschromatographie einer Mischung von Toluol und Mononitrotoluolen

Zusammenfassung

Ein gaschromatographisches Verfahren wird beschrieben, welches es gestattet, die nach verschiedenen Markierungsmethoden tritierten aromatischen Halogen- und Nitrokörper zu trennen. Dadurch wird zugleich auch eine empfindliche Messung der ^{3}H-Aktivität im Gasdurchflußzählrohr erreicht und es läßt sich schnell eine Auskunft über den Ort der ^{3}H-Markierung im Molekül erhalten.

Die ^{3}H-Aktivitätsmessung erfolgt synchron zur Wärmeleitfähigkeitsanzeige über ein direkt in den Gaschromatographen eingebautes Gasdurchfluß-Proportionalzählrohr von etwa 15 ml Volumen, welches noch bei den erforderlichen hohen Temperaturen von über 210°C betrieben werden kann.

Die Schwierigkeiten der Radioaktivitätsmessung in diesem Temperaturbereich liegen darin, daß die (in Milligramm-Mengen vorliegenden) hochsiedenden Stoffe, die mit gebräuchlichen Zählgas-Mischungen betriebenen Proportionalzählrohre stets „vergiften". Daher mußte eine

spezielle Zählgaszusammensetzung gesucht werden, welche eine Zählrohr-Vergiftung vermeidet. Es wurde nun gefunden, daß ein bestimmter Zusatz von Chlor- bzw. Nitrobenzoldampf zu einem Helium-Methangemisch ein gut arbeitendes Zählgas ergab, das selbst beim Durchsatz größerer Substanzmengen des Analysengutes die Zähleigenschaften des Durchflußzählrohres nicht ändert.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Bundesministerium für Atomkernenergie und Wasserwirtschaft sind wir für die Bereitstellung von Geräten sehr zu Dank verpflichtet.

Literatur

[1] Engelkemeir, A. G., u. W. F. Libby: Rev. sci. Instruments **21**, 550 (1950). — [2] Herr, W., F. Schmidt u. G. Stöcklin: diese Z. **170**, 301 (1959). — [3] Lowe, E. A., u. D. Moore: Nature (London) **182**, 133 (1958). — [4] Melander, L.: Nature (London) **161**, 599 (1949). — [5] Rowland, F. S., u. R. Wolfgang: Nucleonics **14**, 58 (1956); Science (Lancaster, Pa.) **121**, 715 (1955). — [6] Tolbert, B. M.: UCRL 8457 (1958). — [7] Wilzbach, K. E.: J. Amer. chem. Soc. **79**, 1013 (1957). — [8] Wilzbach, K. E.: Symposium on Tritium in Tracer Applications, New York 1957. — Zifferero, M.: Energia nucl. **4**, 479 (1957). — [9] Wilzbach, K. E., u. L. H. Dorfman: J. physic. Chem. **63**, 799 (1959). — Rowland, F. S., R. Wolfgang u. T. Pratt: J. Amer. chem. Soc. **78**, 5123 (1956). — Lemmon, R. M.: Science (Lancaster, Pa.) **129**, 1740 (1959). — Willard, J. E., R. W. Ahrens u. M. C. Sauer: J. Amer. chem. Soc. **79**, 3285 (1957). — Ghanem, N. A., u. T. Westermark: RICC/224 Kopenhagen 1960. — [10] Wolfgang, R., u. F. S. Rowland: Analyt. Chemistry **30**, 903 (1958); vgl. diese Z. **166**, 129 (1959).

Prof. Dr. W. Herr, z. Z. Mainz, Saarstraße 23, Max-Planck-Institut für Chemie (Otto Hahn-Institut)

Eduard-Zintl-Institut d. Techn. Hochschule Darmstadt

Radiopapierchromatographie der Isomeren des 1.2.3.4.5.6-Hexachlor-cyclohexans (HCH)

Von

K. H. Lieser und H. Elias

Mit 8 Textabbildungen

(Eingegangen am 15. Oktober 1960)

Die Isomerisierung der Stereoisomeren des 1.2.3.4.5.6-Hexachlorcyclohexans (HCH) wurde in Gegenwart von wasserfreiem Aluminiumchlorid als Katalysator in 1.1.2.2-Tetrachlor-äthan als Lösungsmittel untersucht[2]. Dabei ergab sich die Aufgabe, kleine Mengen (Milligramm) des Isomerengemisches quantitativ zu analysieren.

Auswahl der Analysenmethode

Als hinreichend zuverlässige Analysenmethode ohne vorausgehende Trennung der Isomeren kam nur die IR-Spektroskopie in Frage. Diese Methode erwies sich jedoch im vorliegenden Falle als wenig geeignet; denn bei der Isomerisierung bildeten sich infolge von Reaktionen des Lösungsmittels mit Aluminiumchlorid undefinierte Nebenprodukte, die die quantitative rechnerische Auswertung der IR-Spektren erheblich störten. Die IR-spektroskopische Analyse des Isomerengemisches wurde deshalb ausgeschieden*.

Die Trennung des HCH-Isomerengemisches durch Papierchromatographie ist in der Literatur beschrieben[3]. Diese Methode erwies sich als gut geeignet. Der qualitative Nachweis der Isomeren auf dem Papier konnte verbessert werden: Nach der Trennung wurde das Papier mit einer essigsauren Lösung von Eisen(III)-sulfat, die Resorcin enthielt, besprüht**, an der Luft getrocknet und daraufhin im Trockenschrank zwischen 2 vorgeheizten Glasplatten etwa 1 min auf 230—235° C erhitzt. Die HCH-Isomeren gaben sich bei dieser Behandlung durch eine schwarzbraune Färbung mit gutem Kontrast zum Papieruntergrund zu erkennen. Nach einiger Erfahrung in der Handhabung dieser Anfärbemethode ließen sich so noch 10 μg des γ-HCH, δ-HCH und α-HCH identifizieren (das bedeutet bei 1 mg Isomerengemisch eine Nachweisgrenze von 1%). Das β-HCH ließ sich unter diesen Bedingungen nur schwer anfärben; es benötigt eine etwas höhere Temperatur. Die Nachweisempfindlichkeit nimmt in der Reihenfolge γ-HCH, δ-HCH, α-HCH, β-HCH ab.

Die quantitative photometrische Auswertung der angefärbten Papierchromatogramme war im vorliegenden Falle zu ungenau. Die quantitative Bestimmung der papierchromatographisch getrennten HCH-Isomeren mit Hilfe der IR-Spektroskopie wäre zwar möglich, aber recht umständlich gewesen. Außerdem hätte die Aufarbeitung der Papierchromatogramme für die IR-spektroskopische Bestimmung zusätzliche Fehler gebracht.

Aus diesem Grunde wurden ^{14}C-markierte HCH-Isomere[1] für die Untersuchung der Isomerisierung eingesetzt und die Aktivität der papierchromatographisch getrennten, markierten Isomeren direkt auf dem Papier gemessen. Bei Verwendung von Fensterzählrohren (Geiger-Müller-Zählrohre oder Proportionalzähler mit Fenster) ist die Zählausbeute sehr gering, da ein großer Teil der relativ schwachen β^--Strahlung

---

* Für die Aufnahme der IR-Spektren sind wir der Firma Röhm & Haas G.m.b.H. in Darmstadt zu Dank verpflichtet.

** 2 g Eisen(III)-sulfat (wasserhaltig) wurden in 100 ml Eisessig suspendiert und einige Minuten lang bei Zimmertemperatur geschüttelt. Die Suspension wurde filtriert, und das Filtrat mit 1 g Resorcin versetzt.

des Kohlenstoff-14 bereits im Fenster des Zählers absorbiert wird. Fensterlose Zähler für die Messung von Papierchromatogrammen waren im Handel nicht erhältlich. Die Grundlagen für den Bau von Durchflußzählern mit 4π-Geometrie, die im Proportionalbereich arbeiten, waren bekannt[4]. Die Aufgabe bestand darin, einen solchen fensterlosen 4π-Zähler in der Weise zu bauen, daß ein Papierchromatogramm hindurchgeführt werden konnte.

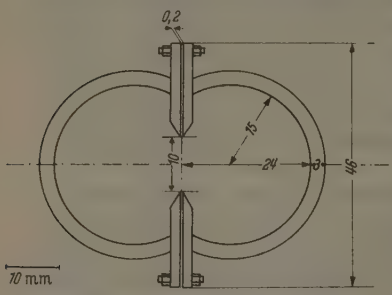


Abb. 1. 4π-Durchflußzähler für Radiopapierchromatographie im Querschnitt

Die technischen Einzelheiten und die Betriebsweise dieses fensterlosen Durchflußzählers für die Messung der Aktivitätsverteilung auf Papierchromatogrammen werden im folgenden beschrieben. Die Anwendung des Zählers wird am Beispiel der quantitativen Bestimmung der ^{14}C-markierten HCH-Isomeren erläutert.

Aufbau und Betriebsweise des 4π-Durchflußzählers

Die Abb. 1 und 2 zeigen den 4π-Durchflußzähler im Querschnitt und im Längsschnitt; in Abb. 3 ist die Durchführung und Befestigung der Zähldrähte zu erkennen. Der Zähler ist aus Messing gefertigt, die Isolierungen aus Plexiglas. Als Zähldrähte

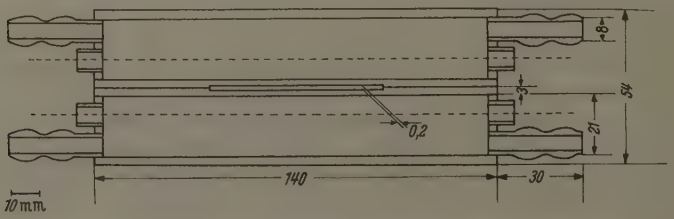


Abb. 2. 4π-Durchflußzähler für Radiopapierchromatographie im Längsschnitt

dienen Wolframdrähte von 50 μ ⌀, die an Kovardrähten befestigt sind. Die Kovardrähte sind in Glasröhren eingeschmolzen. Die Zähldrähte werden durch eine Schraubendruckfeder gespannt. Sie werden in sehr einfacher Weise dadurch befestigt, daß ein Stück Gummischlauch über die Glasröhren geschoben wird.

Die Betriebsweise des Zählers und die Bewegung des Chromatogramms sind in Abb. 4 veranschaulicht: Durch einen Synchronomtor mit stufenweise einstellbarem Vorgelege wird das Papierchromatogramm langsam mit konstanter Geschwindigkeit durch den Zähler hindurchgezogen; die Impulsrate wird gleichzeitig mit einem Schreiber registriert.

Der elektronische Teil der Zähleinrichtung ist in Form eines Blockschaltbildes (Abb. 5) wiedergegeben: An die beiden Zähldrähte sind zwei Vorverstärker (Katho-

denfolger) üblicher Bauart direkt angeschlossen. Von diesen Vorverstärkern führen je zwei Hochspannungskabel und Impulskabel zu der Hochspannungseinheit bzw. zu zwei Breitbandverstärkern mit Diskriminatoren. Die verstärkten Impulse werden einer Ratemetereinheit zugeleitet. Für den Fall, daß die Aktivität auf dem Papierchromatogramm sehr niedrig ist, kann eine Antikoinzidenz-

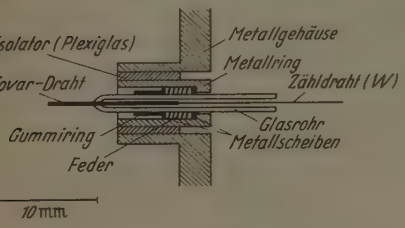


Abb. 3

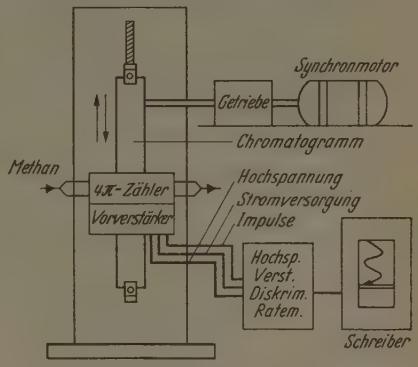


Abb. 4

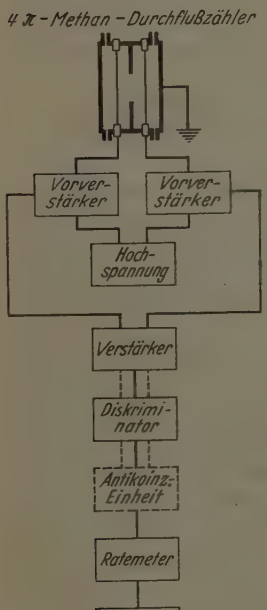


Abb. 5

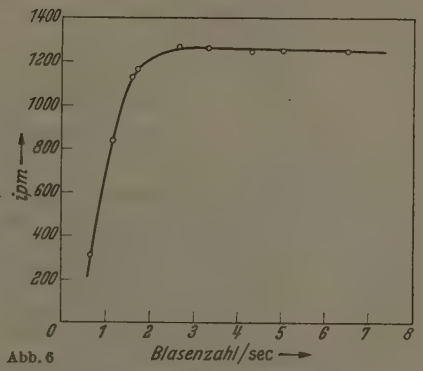


Abb. 6

Abb. 3. Befestigung der Zähldrähte

Abb. 4. Betriebsweise des Zählers und Bewegung des Papierchromatogramms

Abb. 5. Blockschaltbild des elektronischen Teils der Zähleinrichtung (gestrichelt: Antikoinzidenzschaltung)

Abb. 6. Abhängigkeit der Impulsrate vom Methanfluß

schaltung benutzt werden: Die in den beiden Teilen des 4π-Zählers registrierten Impulse werden nach der Verstärkung einer Antikoinzidenzeinheit zugeleitet. Bei dieser Schaltung werden nur noch die Impulse gezählt, die nicht gleichzeitig in beiden Teilen des Zählers registriert werden. Der Untergrund des Zählers kann dadurch erheblich herabgedrückt und die Meßempfindlichkeit gesteigert werden.

Die Schlitze für die Durchführung des Papierstreifens durch das Innere des Zählers bedingen eine erhöhte Undichtigkeit. Deshalb muß die Abhängigkeit der Impulsrate von dem Methanfluß besonders eingehend geprüft werden. In Abb. 6 ist diese Abhängigkeit der Impulsrate von der Blasenzahl pro Sekunde aufgezeichnet. Die Abbildung zeigt, daß bei einem Methanfluß, der größer ist als 2 Blasen/sec, eine konstante Impulsrate gemessen wird. Auf Grund dieser Messungen wurde der Zähler mit einem Methanfluß von 4 ± 1 Blasen/sec betrieben.

Das Arbeitsplateau des Zählers ist in Abb. 7 wiedergegeben. Die Messungen waren gut reproduzierbar.

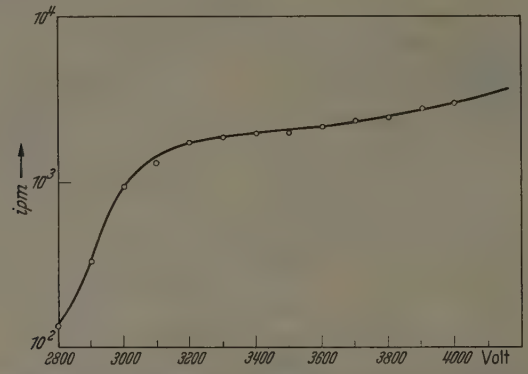


Abb. 7. Arbeitsplateau des 4π-Durchflußzählers (Zähldrahtdurchmesser 50 μ, Methan als Zählgas)

Radiopapierchromatographische Bestimmung der HCH-Isomeren

Für die radiopapierchromatographische Bestimmung der ^{14}C-markierten HCH-Isomeren wurden im Mittel etwa 0,6 mg des Isomerengemisches mit einer Gesamtaktivität von etwa 1,3 μC eingesetzt. Die gemessenen Impulsraten waren recht hoch (größenordnungsmäßig 10^5 Impulse/min) und erlaubten eine hinreichend genaue Auswertung der von dem Schreiber aufgezeichneten Radiogramme. Als Beispiele sind in Abb. 8 drei Radiogramme wiedergegeben.

Die quantitative Auswertung geschah in folgender Weise: Zunächst wurde die Gerade für den Untergrund eingezeichnet. Dann wurden die geschriebenen Kurven durch glatte Kurven ersetzt. In den Bereichen, in denen eine Überlagerung der Impulsraten der einzelnen Isomeren auftrat, wurden die Einzelkurven in der üblichen Weise konstruiert. Daraufhin wurde das Radiogramm mit Hilfe eines Polarplanimeters ausplanimetriert. Die prozentuale Zusammensetzung des Isomerengemisches ergab sich aus dem Verhältnis der Aktivitäten der einzelnen Isomeren zur Gesamtaktivität.

Der relative Fehler dieser Analysenmethode betrug etwa 2% für solche Komponenten eines Gemisches, die in größeren Mengen vorhanden waren ($> 50\%$); für Komponenten, die in kleineren Mengen vorlagen ($< 10\%$), stieg der relative Fehler stark an. Dies führte dazu,

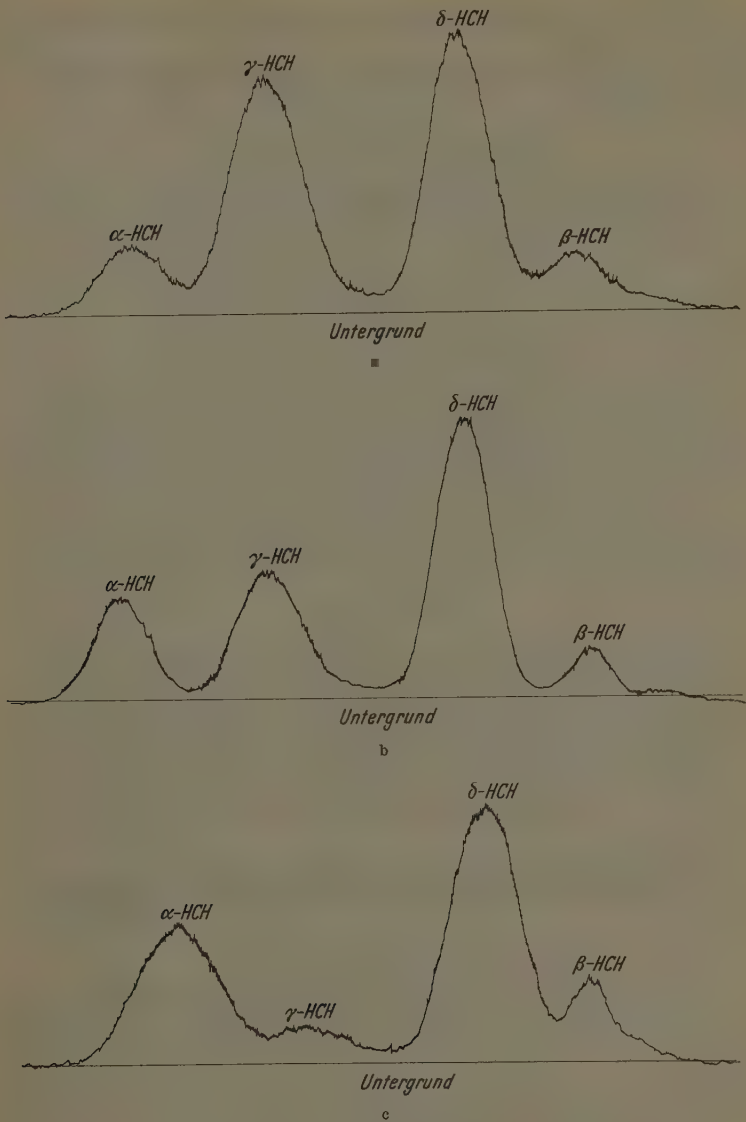


Abb. 8 a—c. Radiopapierchromatogramme von Isomerengemischen des HCH: a 9,7% α-HCH, 7,9% β-HCH, 40,7% γ-HCH, 41,7% δ-HCH; b 17,2% α-HCH, 6,1% β-HCH, 26,9% γ-HCH, 49,8% δ-HCH; c 31,4% α-HCH, 10,9% β-HCH, 8,1% γ-HCH, 49,6% δ-HCH

daß die Nachweisgrenze dieser Methode bei etwa 1% eines beliebigen HCH-Isomeren lag.

Die fortschreitende Isomerisierung des γ-HCH infolge der Gleichgewichtsreaktion

$$\gamma\text{-HCH} \underset{\searrow}{\overset{AlCl_3}{\rightleftharpoons}} \delta\text{-HCH} \underset{\searrow}{\overset{AlCl_3}{\rightleftharpoons}} \alpha\text{-HCH}$$

wird aus Abb. 8 deutlich. Nach einiger Zeit hat sich bereits ein großer Teil des vorgelegten γ-HCH zu δ-HCH isomerisiert (Abb. 8a); der Anteil des α-HCH ist noch gering. Im weiteren Verlauf der Reaktion haben sich die Anteile der einzelnen Isomeren stark verschoben (Abb. 8b); der Anteil des γ-HCH hat erheblich abgenommen, der Anteil des δ-HCH ist noch etwas angestiegen, und der Anteil des α-HCH ist bedeutend größer geworden. In einem späteren Stadium der Reaktion (Abb. 8c) ist der Anteil des γ-HCH sehr klein geworden; der Anteil des δ-HCH hat sich praktisch nicht geändert, aber der Anteil des α-HCH ist stark angestiegen. Der Vergleich der Kurven a, b und c zeigt außerdem, daß der Anteil des β-HCH praktisch gleich bleibt. Dies ist ein Zeichen dafür, daß das β-HCH bei dieser Gleichgewichtsreaktion nicht beteiligt ist.

Über die quantitative Behandlung dieses Isomerisierungsgleichgewichtes der HCH-Isomeren wurde an anderer Stelle ausführlich berichtet[2].

Zusammenfassung

Für die quantitative Auswertung der Aktivitätsverteilung auf Radiopapierchromatogrammen wurde ein 4π-Durchflußzähler gebaut. Der Aufbau und die Betriebsweise dieses Zählers werden beschrieben. Die Anwendung der Radiopapierchromatographie als quantitative Analysenmethode wird am Beispiel des Isomerisierungsgleichgewichtes

$$\gamma\text{-HCH} \rightleftharpoons \delta\text{-HCH} \rightleftharpoons \alpha\text{-HCH}$$

erläutert.

Der Vereinigung von Freunden der Technischen Hochschule Darmstadt und dem Fonds der Chemischen Industrie danken wir für finanzielle Unterstützung.

Literatur

[1] Elias, H., K. H. Lieser u. H. W. Kohlschütter: Chem. Ber. **93**, 2125 (1960). — [2] Elias, H., K. H. Lieser u. H. W. Kohlschütter: Chem. Ber. **93**, 2128 (1960). — [3] O'Colla, P.: J. Sci. Food Agric. **3**, 130 (1952). — [4] Rossi, B. B., and H. H. Staub: Ionization Chambers and Counters, McGraw-Hill, New York 1949.

Dr. K. H. Lieser u. Dr. H. Elias, Eduard-Zintl-Institut der Technischen Hochschule Darmstadt

Ammoniaklaboratorium der Badischen Anilin- & Soda-Fabrik AG.,
Ludwigshafen am Rhein

Die Bildung von Terephthalat durch Carboxylgruppenumlagerung in einer $^{14}CO_2$-Atmosphäre

Von

O. Riedel und H. Kienitz

(Eingegangen am 22. November 1960)

Um die Bildung von Terephthalat aus o-und m-Phthalat sowie aus Benzoat, die unter Druck und Wärme erfolgt, aufzuklären, stellten wir Autoklavenversuche mit einer ^{14}C-markierten Kohlendioxydatmosphäre an.

Die Messung des entstandenen Dikaliumterephthalats mit einem Gasphasen-Proportionalzählrohr zeigte, daß der Prozeß „extramolekular" verläuft und nicht bloß in einem internen Platzwechsel besteht. Die Kohlenstoffatome des Benzolringes werden von der Umlagerung nicht berührt.

Ein Vergleich mit den theoretischen Kurven für die höchsterreichbare Extramolekularität, die sich aus ganz selbstverständlichen Annahmen ableiten ließen, zeigt, daß die experimentellen Ergebnisse nicht die Beweglichkeit von mehr als einer Carboxylgruppe je Molekül verlangen.

Entscheidend für die Ausbeute ist der Wassergehalt der Autoklavbeschickung, deren Umlagerung und deren Abbau linear von der Wassermenge abhängen.

Die ausführliche Darstellung erschien in „Angewandte Chemie" **72**, 738 (1960). — Die Zählapparatur wurde beschrieben von H. Kienitz und O. Riedel, diese Z. **179**, 93 (1961).

Dr. O. Riedel; Dr. H. Kienitz;
Ammoniaklaboratorium der Badischen Anilin- & Soda-Fabrik AG.,
Ludwigshafen am Rhein

Org.-Chem. Institut der Techn. Hochschule München (Direktor: Prof. Dr. F. Weygand), I. Med. Klinik der Universität München (Direktor: Prof. Dr. H. Schwiegk) und Med. Universitäts-Poliklinik (Direktor: Prof. Dr. W. Seitz)

Nachweis und Verteilung von Sulfanilylharnstoffen in Zellstrukturen und Autoradiographie von Gewebsschnitten mit dem tritium-markierten oralen Antidiabeticum

Von

G. Schäfer, W. Lamprecht und K. Stuhlfauth

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 23. November 1960)

Bei Untersuchungen über die Wirkungsweise eines Pharmakons ist eine der bedeutsamsten Fragen, dessen Angriffsort festzustellen. Solchen Untersuchungen muß die Kenntnis der Verteilung im Organismus vorausgehen; vor allem muß geklärt sein, ob die Substanz überhaupt in die Zellen einzudringen vermag, oder etwa nur in extracellulären Räumen wirksam ist. Gerade der letzte Gesichtspunkt ist mehr ein analytisches Problem, denn hier ist die Klärung relativ schwierig, schon deshalb, weil bei einem Zellverband, wie ihn jedes Gewebe darstellt, eine Trennung zwischen intra- und extracellulärem Raum nicht ohne weiteres möglich ist.

Die für die Therapie des Diabetes Mellitus heute so bedeutsam gewordenen Sulfanilylharnstoffe[4] wurden im Rahmen dieser Fragestellungen untersucht. Trotz einer großen Zahl von Arbeiten[1,6] konnten bisher keine klaren Ergebnisse über deren Verteilung und deren Auftreten in der Zelle erhalten werden. Die Klärung unserer Aufgabe könnte bei diesen Stoffen recht entscheidend sein, da verschiedentlich eine reine Membranwirkung der oralen Antidiabetica angenommen wird, ein Wirkungsmechanismus also, der ein Eindringen in die Zelle nicht nötig machen würde. Die Aufklärung der Verteilung der Sulfanilylharnstoffe und ihre genaue Lokalisation im Zellverband war Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen.

Bei einer Gruppe von oralen Antidiabeticis handelt es sich um Harnstoffderivate, wobei die eine Aminogruppe durch einen Kohlenwasserstoffrest, cyclisch oder offenkettig-gesättigt, die andere durch den Sulfanilylrest substituiert ist. Es liegt also die Gruppierung R_1-NH-CO-NH-SO_2-phenyl-R_2 vor. R_1 ist bei den meisten Präparaten ein Butylrest, R_2 eine Amino- oder Methylgruppe. Ist letzteres der Fall, so kann die Substanz schlecht durch eine Farbreaktion erfaßt werden; ist R_2 jedoch, wie in unserem Falle, eine Aminogruppe, so kann die Reaktion nach

Marshall u. Bratton[2,3], welche dem Nachweis von Sulfonamiden im Blut dient, herangezogen werden. Dazu wird ein aliquoter Teil der zu untersuchenden Lösung mit Salzsäure und Natriumnitritlösung versetzt, wobei sofortige Diazotierung eintritt. Zur Zerstörung des überschüssigen Nitrits wird nach 2 min Reaktionszeit Ammoniumsulfamatlösung zugesetzt. Mit N-Naphthyl-1-äthylendiamin wird das Diazoniumsalz dann zu einem Azofarbstoff gekuppelt, der bei 546 nm eine charakteristische Absorption aufweist, deren Intensität photometrisch bestimmt werden kann. Die Reaktion verläuft quantitativ und die Abhängigkeit der Extinktion von der eingesetzten Menge Sulfanilylharnstoff erwies sich als direkt proportional. Mit dieser Reaktion kann etwa 1 μg/ml erfaßt werden. — Um einem Einwand, daß mit der Reaktion nach Marshall u. Bratton auch Abbauprodukte neben dem intakten Sulfanilylharnstoffmolekül erfaßt werden könnten, zu begegnen, sei erwähnt, daß aus anderen Untersuchungen solche Metaboliten bereits bekannt sind. Ist R_2 in der obigen Formel ein Methylrest, so wird das Molekül an dieser Stelle zur Säure oxydiert. Ist R_2 eine Aminogruppe, so wird diese acetyliert. Beide „entgiftete" Metabolite sind Stoffe, welche selbstverständlich keine Diazotierung geben können. Freie Sulfanilsäure tritt nach unseren Untersuchungen bei Sulfanilylharnstoffgabe nicht im Stoffwechsel auf. Eine Spaltung des Moleküls kann überhaupt nur dann eintreten, wenn der Benzolkern mehrfach substituiert ist.

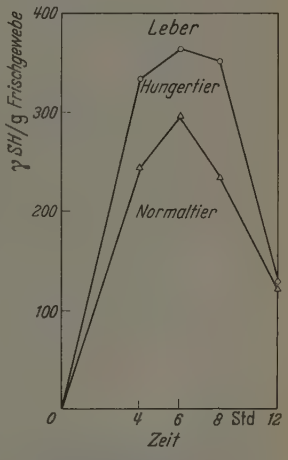


Abb. 1. Abhängigkeit des Gehaltes an Sulfanilylharnstoff (SH) von der Belastungszeit (in Leber)

Wir haben Ratten mit einer Dosis von 300 mg/kg oral mit Sulfanilylharnstoff belastet; nach 30 min wurden die Tiere getötet. In den mit Perchlorsäure enteiweißten Homogenaten von Leber, Muskel, Pankreas und Blut konnte das Pharmakon exakt auf seinen Gewebsgehalt analysiert werden, wobei der Befund besonders interessant war, daß die Substanz sich niemals im Gehirn auffinden ließ.

Verfolgt man den Gehalt verschiedener Gewebe an Sulfonylharnstoff quantitativ über mehrere Stunden nach der Gabe des Pharmakons, so findet man, daß eine kurzzeitige Anreicherung in allen Organen, außer Gehirn, stattfindet.

Auf der Ordinate ist in Abb. 1 der Gehalt an Sulfanilylharnstoff in Mikrogramm je Gramm Frischgewebe angegeben, auf der Abszisse die

Belastungszeit in Stunden. Die Abbildung zeigt die Verhältnisse in Leber. Ein gleiches Bild liefern die Analysen mit allen anderen untersuchten Geweben. Ein Maximum des Gewebegehalts tritt nach 6—8 Std ein und ein relativ rascher Abfall folgt dieser Gewebeanreicherung, wobei die rasche Ausscheidung der Substanz im Urin parallel läuft.

In Abb. 1 sind zwei Kurvenverläufe aufgetragen. Der erste zeigt den Verlauf bei normal ernährten Tieren, der andere, mit durchwegs höheren Werten, den Verlauf bei Hungertieren, denen 48 Std vor Versuchsbeginn das Futter entzogen wurde. Diese Befunde lassen sich gut reproduzieren und sie sind statistisch gesichert. In diesen Fällen verhält sich der Blutspiegel von Sulfanilylharnstoff gerade umgekehrt zum Gewebsgehalt. Es ist also bei Normaltieren der Blutspiegel hoch, bei Hungertieren niedrig, wogegen der Gewebsgehalt bei Normaltieren niedrig, bei Hungertieren aber hoch zu liegen kommt.

Aus diesen Befunden konnten wir bereits auf eine verschiedene Verteilung der Sulfanilylharnstoffe zwischen intra- und extracellulärem Raum schließen.

Steht die Verteilung eines Metaboliten zwischen intra- und extracellulärem Raum in einem Gleichgewicht, ermöglicht durch freie Diffusion, so dürfte sich rasch ein konzentrationsgleicher „steady state" einstellen. Wenn wir nun bei Hungertieren mit niedrigem Blutspiegel, im Gegensatz zu Normaltieren, einen relativ hohen Gewebsgehalt finden, so darf man daraus folgern, daß eine Anreicherung des Sulfanilylharnstoffes im intracellulären Raum stattgefunden hat.

Wir haben deshalb den Gehalt an Sulfanilylharnstoff in intracellulären Partikeln abhängig von der Zeitdauer nach Verabreichung des Pharmakons untersucht. Es gelang uns, die Substanz in Lebermitochondrien, die sich durch fraktioniertes Zentrifugieren eines isotonen Leberaufschlusses gewinnen lassen, mit der Farbreaktion nach Marshall u. Bratton nachzuweisen. Hierbei zeigte sich jedoch, daß die Analyse bei intakten Mitochondrien versagt. Erst ein Aufschluß der Partikel durch mehrmaliges Einfrieren oder Kochen mit verd. Salzsäure führt zu einer quantitativen Bestimmung.

In weiteren Untersuchungen konnten wir die intracelluläre Lokalisation des Sulfanilylharnstoffes sichtbar demonstrieren. Der Versuch, eine Färbung auf den histologischen Schnitt zu übertragen, schlug fehl. Die Gründe sind einerseits die gute Wasserlöslichkeit des Pharmakons in den verwendeten Färbe- und Entwässerungsbädern, anderseits treten bei der Formolfixierung mit dem Sulfanilylrest der Verbindung unspezifische Nebenreaktionen ein, weil dieser mit Formaldehyd zum Azomethin kondensiert.

Eine weitere Schwierigkeit ist, daß der Gewebsgehalt bei einer Schichtdicke von 10—15 μ zu gering ist, um damit eine exakte colorimetrische oder histologische Reaktion erwarten zu können.

Zur Klärung unserer Fragestellung haben wir diesen Sulfanilylharnstoff mit Tritium markiert. Dazu war es nötig, die Substanz, ausgehend von am Benzolkern in o-Stellung tritierter Sulfanilsäure, zu synthetisieren. Wie bekannt, eignen sich tritierte Verbindungen ausgezeichnet zur Sichtbarmachung intracellulärer Orte auf Grund der geringen Reichweite der energiearmen β-Strahlung. Bei solchen Autoradiographien ist nicht nur ein hochempfindliches Filmmaterial die erste Voraussetzung, sondern es ist ebenso auf einen engsten Kontakt zwischen Objekt und Filmschicht zu achten.

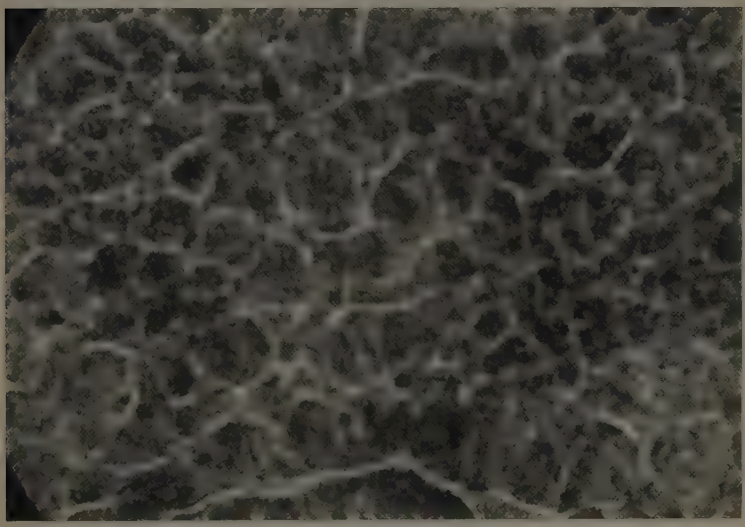


Abb. 2. Schnitt des Pankreasgewebes einer Ratte nach Belastung mit ^{3}H-Sulfanilylharnstoff

Durch Verwendung von sogenannten „stripping emulsions", das sind Emulsionen ohne Schutzschicht, die ähnlich wie „Abziehbilder" direkt über den histologischen Schnitt geklebt werden, konnten wir die Lokalisation von ^{3}H-Sulfanilylharnstoff in Geweben sichtbar machen. Bei entsprechend langen Expositionszeiten kann man mit außerordentlich geringen Aktivitäten sehr gute Autoradiographien erzielen.

Zur Darstellung dieser Autoradiographien verabreichten wir an Ratten 1000 mg ^{3}H-markierten Sulfanilylharnstoff mit einer Gesamtaktivität von 160000 Ipm. Die Tiere wurden nach 30 min getötet, die Gewebsteile nach den bekannten Verfahren in Paraffin eingebettet und Schnitte abgehoben. Nach dem Aufkleben auf Objektträger wurden die Schnitte in Toluol entparaffiniert und nach kurzem Trocknen unmittelbar mit den

„stripping"-Filmen eingedeckt. Nach 3—4 Wochen sind die Filme, ohne sie dabei von Schnitt und Objektträger zu entfernen, entwickelt worden. Der Vorteil dieses Verfahrens ist vor allem darin zu sehen, daß gleichzeitig sowohl die histologische Untersuchung der Gewebestruktur, als auch das darüberliegende autoradiographische Bild mikroskopisch differenziert werden kann.

Abb. 2 zeigt als Beispiel eines solchen Versuches den Schnitt des Pankreasgewebes einer Ratte nach Belastung mit ^{3}H-Sulfanilylharnstoff.

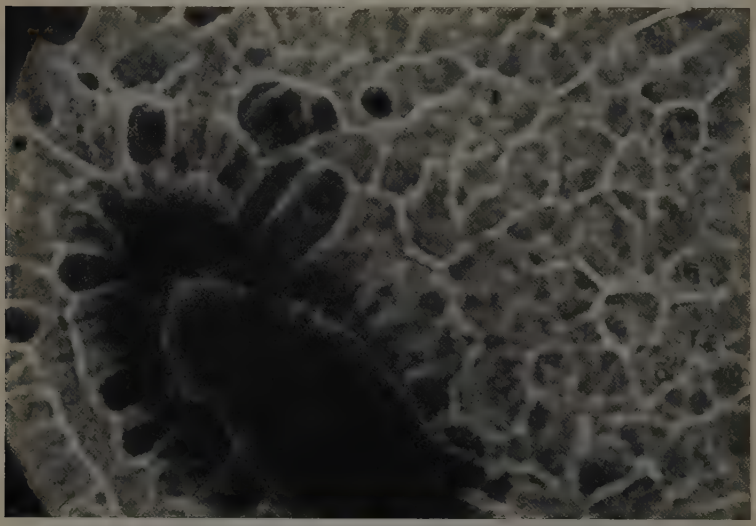


Abb. 3. Leberschnitt nach Belastung mit ^{3}H-Sulfanilylharnstoff

Die mikroskopische Aufnahme läßt sowohl die Zellstruktur des Gewebsschnittes erkennen, zum anderen präsentiert sich deutlich die Schwärzung des Films in einer statistischen Verteilung über den ganzen Schnitt hinweg.

Mit Versuchen, bei denen hohe Aktivitäten im Pharmakon verwendet wurden, haben wir gesehen, daß eine derartige Auflösung zwischen Gewebsstruktur und Schwärzung nicht mehr möglich ist. Es ist daher nicht zweckmäßig bei der Durchführung solcher Versuche zu hohe Aktivitäten an Tritium einzusetzen.

Abb. 3 stellt einen Leberschnitt aus der gleichen Versuchsreihe dar. Auch hier ist eine gleichmäßige Verteilung des markierten Sulfanilylharnstoffes im ganzen Gewebe deutlich. Zufällig wurde bei diesem Präparat ein Gallengang angeschnitten, der in der Abbildung tief geschwärzt

erscheint. Diese Beobachtung führte uns zu der Annahme, Sulfonylharnstoffe könnten in den sogenannten enterohepatischen Kreislauf eintreten, was für die Frage einer Stoffwechselwirkung sehr bedeutsam ist. Ferner wäre damit ein Hinweis gegeben, wonach das Antidiabeticum über die Gallenwege zur Ausscheidung gelangen müßte.

Wie man heute annimmt, besteht die Stoffwechselwirkung der oralen Antidiabetica unter anderem in einer Pankreas-stimulierenden Wirkung. Man glaubt also, daß es unter dem Einfluß von Sulfanilylharnstoff auf

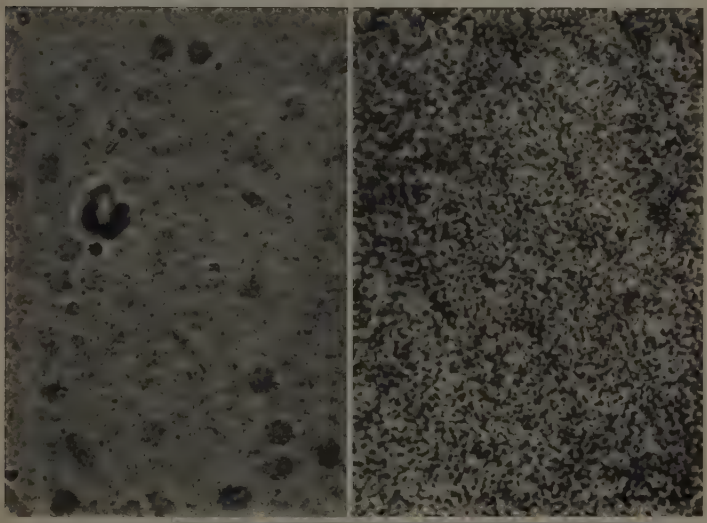


Abb. 4. Kontrollversuch. Rechts: Radioautogramm eines Leberschnitts mit ^{3}H-Sulfanilylharnstoff; links: Schnitt mit inaktivem Pharmakon

das Pankreas zu einer höheren Insulinausschüttung kommt[5]. Wir haben deshalb erwartet, bei unseren Untersuchungen besonders hohe Konzentrationen der ^{3}H-markierten Verbindung in den Insulin-produzierenden B-Zellen des Pankreas zu finden. Wie wir zeigen konnten, ist dies tatsächlich nicht der Fall. Ein Pankreasgewebe zeigt im Vergleich zu anderen Organen keinen relativ hohen Sulfonylharnstoffgehalt. Gehirnschnitte zeigen, daß überhaupt keine Aufnahme von Sulfanilylharnstoff in diesen Zellen stattfindet.

Abb. 4 zeigt das Beispiel eines Kontrollversuchs. In der rechten Bildhälfte ist das Radioautogramm eines Leberschnitts mit tritiertem Sulfanilylharnstoff zu sehen, in der linken Bildhälfte der analoge Schnitt einer Leber mit inaktivem Pharmakon.

Zusammenfassung

a) Das orale Antidiabeticum wird, wenn auch kurzzeitig, in Geweben angereichert (Leber, Pankreas, Muskel). Im Gehirn findet keine Aufnahme statt.

b) Der Sulfanilylharnstoff ist in der Lage, in den intracellulären Raum einzutreten. Sogar in Mitochondrien ist nach oralen Gaben eine Anreicherung feststellbar.

c) Die Ergebnisse dieser Untersuchungen stehen im Widerspruch zu der häufig geäußerten Ansicht, der Wirkungsmechanismus der Sulfanilylharnstoffe sei ausschließlich in einer Wirkung auf die Zellmembrane zu suchen.

Literatur

[1] Bänder, A., A. Häussler u. J. Scholz: Dtsch. Med. Wschr. Nr. **36**, 1557 (1957). — [2] Helmreich, E., S. Goldschmidt, W. Lamprecht u. F. Ritzl: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **292**, 203 (1953). — [3] Marshall, E. K., u. A. C. Bratton: J. biol. Chemistry **128**, 537 (1939). — [4] Sonderhefte: Dtsch. Med. Wschr. Nr. **21**, **22**, 823—906 (1956) und Nr. **36**, 1514—1591 (1957). — [5] Stuhlfauth, K., H. Mehnert, G. Schäfer u. G. Kaliampetsos: Klin. Wschr. **38**, 825 (1960). — [6] Wick, A. N., B. Britton u. G. Grabowski: Metabolism **5**, 739 (1956).

Priv.-Doz. Dr. W. Lamprecht und Dipl.-Chem. G. Schäfer, Organ.-chem. Institut der Techn. Hochschule München 2, Arcisstraße 21, und I. Medizin. Klinik der Universität München, Prof. Dr. K. Stuhlfauth, Med. Universitäts-Poliklinik München

---

Organisch-Chemisches Institut der Technischen Hochschule und I. Medizinische Klinik der Universität München

Bestimmung von Corticosteroiden im Blut durch Doppelmarkierung und Messung von ^{14}C und ^{3}H in der Gasphase

Von

R. Ködding*, W. Lamprecht, H. P. Wolff, J. Karl und **Kh. R. Koczorek**

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 29. Oktober 1960)

Die Corticosteroide werden in der Nebennierenrinde (NNR) synthetisiert und ins Blut sezerniert. Als Mineralocorticoide werden die Rindenhormone bezeichnet, die ihre hauptsächlichste Wirkung auf den Elektrolytstoffwechsel, d. h. Natrium- und Kaliumstoffwechsel, entfalten. Der Hauptvertreter dieser Gruppe ist das Aldosteron (18-Oxo-corticosteron). Elektrolythaushalt und Wasserhaushalt des Organismus sind eng miteinander verknüpft. Als Glucocorticoide faßt man die Nebennierenrindenhormone zusammen, deren deutlichste Effekte im Kohlenhydrat- und Eiweißstoffwechsel sichtbar werden. Als wirksamster Vertreter

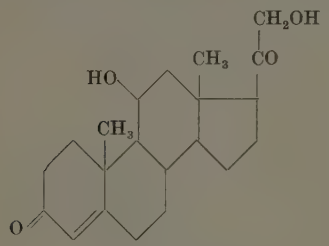
* Auszug aus der Dissertation Reinhard Ködding, Technische Hochschule München 1961.

dieser Gruppe gilt das Cortisol. Daß Mineralocorticoide auch Glucocorticoideigenschaften besitzen und, umgekehrt, Glucocorticoide auch den Wasser- und Elektrolytstoffwechsel beeinflussen, ist bei dieser groben Einteilung zu berücksichtigen. Weiterhin werden von der NNR auch Androgene sezerniert. Die Produktion von Oestrogenen und Progesteron in der NNR ist heute ebenfalls bekannt.

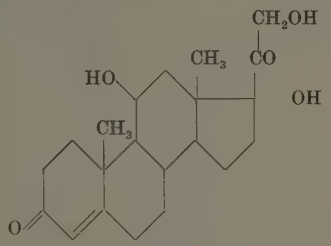
Die Konzentration der Corticosteroide im menschlichen peripheren Blut beträgt einige Mikrogramm je 100 ml Plasma. Die Konzentration des Aldosterons ist dagegen nur etwa $^1/_{100}$ der der übrigen Corticosteroide. In pathologischen Fällen ist die Konzentration der einzelnen Hormone beträchtlichen Änderungen unterworfen, so daß ihre quantitative Bestimmung dem Kliniker wertvolle Aufschlüsse liefert.

Mit der Erforschung und Bestimmung der Corticosteroide sind Namen wie Reichstein[7], Kendall, Wintersteiner, Bush[2], Simpson[1,7], Tait[1,7], Ayres[1], Wettstein[7], Neher[7], Peterson[3,4,8] u. a. verbunden.

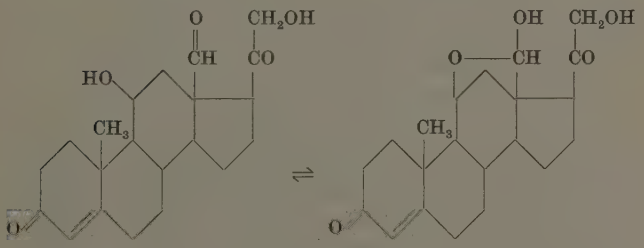
Die Corticosteroide sind Derivate des allo-Pregnans:



Corticosteron



Cortisol
(Hydrocortison)



Aldosteron

Sie besitzen alle Δ^4-3-Oxo-Struktur und eine Ketolseitenkette am C-Atom 17. Sie unterscheiden sich an ihren funktionellen Gruppen an den C-Atomen 11 und 17, und zwar befindet sich an C-11 entweder Wasserstoff, die Hydroxyl- oder Oxogruppe. Diese drei Möglichkeiten kombinieren sich mit Hydroxyl oder Wasserstoff am C-Atom 17. Zu

diesen 6 Steroiden kommt das erst 1954 entdeckte Aldosteron, das an C-18 eine Aldehydgruppe trägt und in Lösung mit seinem inneren Halbacetal zum C-Atom 11 im Gleichgewicht steht. Die 7 wichtigsten Corticosteroide sind: Corticosteron, Cortisol, Cortison, Aldosteron, Cortexon, Reichsteins Substanz S und Kendalls compound A.

Die klassische quantitative Bestimmungsmethode der Steroide ist die Photometrie. Ihre Fehlerbreite ist im niedrigen Konzentrationsbereich beträchtlich, zumal der quantitativen Bestimmung eines Steroids eine umfangreiche und somit verlustreiche Isolierung und Reinigung vorangehen muß, da die verwendeten Farbreaktionen nicht spezifisch sind. Durch Zusatz von ^{14}C-markiertem Steroid konnte man später an Hand des Abfalls der Radioaktivität die Verlustrate bestimmen (sogenannte Verdünnungsanalyse). In neuerer Zeit wurde auch die quantitative Bestimmung durch Messung von Radioaktivität durchgeführt, indem die Ketolseitenkette am C-Atom 21 des Steroids mit ^{3}H-markiertem Essigsäureanhydrid in Gegenwart von absolutem Pyridin acetyliert wurde. Diese Bestimmung ist wesentlich empfindlicher als die photometrische. Durch eine derartige Doppelmarkierung läßt sich sowohl die Verlustbestimmung als auch die quantitative Bestimmung gleichzeitig nebeneinander durchführen (siehe Tabelle).

Tabelle. *Quantitative Bestimmung von Corticosteroiden durch Doppelmarkierung* (Rechenbeispiel)

Steroidgehalt des Plasmas	x μg
Zugabe von ^{14}C-Steroid	0,002 $\mu g \wedge$ 200 Ipm ^{14}C
^{14}C-Steroidgehalt nach Isolierung	0,001 $\mu g \triangleq$ 100 Ipm ^{14}C
Gesamtsteroidverlust*	50,0 %
Gesamtsteroidgehalt nach Isolierung	0,011 $\mu g \wedge$ 1500 Ipm ^{3}H
Gesamtsteroidgehalt des Plasmas	0,022 μg
Zugesetztes ^{14}C-Steroid	0,002 μg
Steroidgehalt x des Plasmas	0,020 μg

* Gesamtsteroid = natürliches Steroid + ^{14}C-Steroid.

Bisher wurde bei den Corticosteroidbestimmungen die Messung von ^{14}C und ^{3}H mit einem Flüssigkeits-Scintillations-Spektrometer durchgeführt. Hierbei wird zunächst bei einer höheren Spannung die Summe der Impulsraten beider Nuklide und anschließend bei einer niederen Spannung die Impulsrate von ^{14}C gemessen. Die Impulsrate von ^{3}H kann dabei nur durch Differenzbestimmung angegeben werden.

Wir haben die Messung von ^{14}C und Tritium in der Gasphase durchgeführt. Nach Verbrennung der Substanz mit $KClO_4$ werden $^{14}CO_2$ und $^{3}H_2O$ in einer Vakuumapparatur, wie sie von Simon u. Mitarb.[6] beschrieben ist, durch fraktioniertes Ausfrieren getrennt und — letzteres nach Reduktion mit amalgamiertem Zink zu Tritium — im Gasfüll-

zählrohr gemessen. Nach dieser Methode können beide Nuklide direkt nebeneinander gemessen werden. Die Zählausbeute von Tritium ist bei der Messung in der Gasphase um mehr als das Doppelte höher als bei der Flüssigkeits-Scintillations-Spektrometrie.

Die quantitative Bestimmung von Corticosteroiden im Blut durch das Verfahren der Doppelmarkierung wurde in unserem Laboratorium überarbeitet. Bei der Durchführung der Methode gehen wir wie folgt vor:

Das zu untersuchende Blut wird nach Zusatz von Heparinoid, um Hämolyse zu verhindern, zentrifugiert und das Plasma abgetrennt. Einer bestimmten Plasmamenge wird das zu bestimmende Corticosteroid als 4-^{14}C-Steroid in definierter Menge und spezifischer Aktivität zugesetzt. Die zugesetzte Menge soll einen Bruchteil der im Plasma erwarteten Steroidmenge betragen. Die Extraktion des Plasmas erfolgt durch hochtouriges Rühren mit dem doppelten Volumen Chloroform. Die entstandene Emulsion wird durch Zentrifugieren getrennt. Nach 3maliger Extraktion gelangen die vereinigten Extrakte zur Vorreinigung.

Während bisher bei der Bestimmung von Corticosteroiden durch Doppelmarkierung[3,5,8] der gesamte Extrakt nach Waschen mit Lauge, Säure und Wasser acetyliert wurde, haben wir versucht, möglichst reine Substanzen zur Acetylierung zu bringen. Um die Lipide abzutrennen, die sich zu den Corticosteroiden mengenmäßig wie etwa 30000:1 verhalten, wird der Extrakt auf eine kleine Säule von 3 g Silicagel gebracht und die gesamten Lipide und schwach polaren Androgene und Oestrogene sowie Cortexon und Kendall A mit Chloroform herausgewaschen. Die stärker polaren Corticosteroide werden hierbei vom Silicagel adsorbiert; sie werden anschließend mit einer 5%igen Lösung von Methanol in Chloroform von der Säule eluiert. Während durch Waschen mit Lauge lediglich die freien Fettsäuren entfernt werden, die nur etwa ein Drittel der Lipide betragen, werden an der Silicagelsäule auch Neutralfette, Phospholipide und Cholesterin abgetrennt.

Das Eluat der Corticosteroide wird im Vakuum zur Trockene eingedampft und im System Benzol-Methanol-Wasser (2:1:1) [Bush B 5] auf Whatman Nr. 1 absteigend papierchromatographiert. Dabei trennen sich die Steroide mit steigendem R_f-Wert wie folgt auf: Cortisol, Aldosteron, Cortison, Corticosteron und Reichstein S.

Die Fixierung der Steroide erfolgt durch Registrierung der ^{14}C-Radioaktivität mit einem Radiopapierchromatographen. Hierbei läuft der Chromatogrammstreifen automatisch an einem Zählrohr vorbei, das über ein Strahlungsmeßgerät mit einem Linienschreiber gekoppelt ist. Dieser zeigt laufend die mittlere Impulsrate auf einem Diagrammstreifen an, der mit dem Papierchromatogramm synchron läuft. Die Fläche unter der Kurve gibt die Radioaktivität wieder.

Die so fixierte Zone wird ausgeschnitten und mit Methanol eluiert. Da ^{14}C-Aldosteron noch nicht verfügbar ist, wird zur Bestimmung dieses Hormons die Zone zwischen Cortisol und Cortison eluiert. Werden die beiden letzteren nicht gleichzeitig bestimmt, so setzt man dem Steroidgemisch vor der Papierchromatographie je $\sim 3\,\mu g$ dieser Hormone zu, um sie durch Kontaktphotographie im UV fixieren zu können, denn bei 240 nm besitzen die Corticosteroide bekanntlich ein Absorptionsmaximum. Bei der Bestimmung von Cortisol kann man dank seiner relativ hohen Konzentration im Plasma auf die papierchromatographische Vortrennung verzichten. Man sollte dann nach Abtrennung der Lipide an der Silicagelsäule mit Chloroform erst noch die schwächer polaren Verbindungen Corticosteron, Reichstein S und den größeren Anteil von Cortison mit einer 1%igen Lösung von Methanol in Chloroform eluieren.

Nach in der Literatur beschriebenen Verfahren[1,3,4,5,8] ist man von der Voraussetzung ausgegangen, daß bei der Acetylierung der Corticosteroide

die Hydroxylgruppe der Ketolseitenkette gegenüber den Hydroxylgruppen am Steroidgerüst bevorzugt reagiert, so daß sich im allgemeinen nur die 21-Monoacetate bilden würden. Beim Aldosteron soll die Hydroxylgruppe an C-18, die durch die Acetalbildung entsteht, genauso reaktionsfähig sein, also ausschließlich Aldosterondiacetat entstehen. Deshalb wurden bei der quantitativen Bestimmung des Aldosterons das Diacetat, der übrigen Corticosteroide die Monoacetate analysiert.

Die Acetylierung, der wesentlichste Schritt der Bestimmungsmethode, haben wir eingehend untersucht. Wir haben dabei gefunden, daß die Gleichgewichtskonstanten der Acetylierungsreaktion von Corticosteron, Cortisol und Aldosteron sehr verschiedene Werte besitzen. Ist unter gleichen Acetylierungsbedingungen die Acetylierung von Corticosteron zum Monoacetat praktisch quantitativ, so ist beim Cortisol der Anteil an noch unverestertem Steroid beträchtlich. Erhöht man den Überschuß an Essigsäureanhydrid bis die Umsetzung von Cortisol zu Monoacetat vollständig ist, so ist die Ausbeute an Aldosterondiacetat immer noch unzureichend. Erhöht man den Überschuß an Acetanhydrid weiter, so entstehen bereits merkliche Mengen an Corticosterondiacetat. Das würde sowohl die Verluste von Corticosteron erhöhen als auch die Aldosteronbestimmung stören, da Corticosterondiacetat bei der anschließenden papierchromatographischen Reinigung schneller als Corticosteronmonoacetat wandert und vor allem einen dem Aldosterondiacetat ähnlichen R_f-Wert besitzt. Ebenso entstehen bei größerem Überschuß an Acetanhydrid erhebliche Mengen an Di- und Triacetat des Cortisols. Die Untersuchung der Acetylierungsprodukte wurde wiederum mit dem Radiopapierchromatographen durchgeführt, dessen Diagramme ein anschauliches Bild von der Ausbeute der einzelnen Acetate geben (siehe Abb. 1).

Zudem läßt sich ein zu großer Überschuß des Acetylierungsmittels bei der anschließenden Reinigung schlecht entfernen, so daß die Tritiumbestimmung zu hohe Werte liefert.

Aus diesem Grunde trennen wir die Steroide vor der Acetylierung papierchromatographisch, um das Acetylierungsmittel im einzelnen Fall besser dosieren zu können. Das ist besonders beim Aldosteron wichtig, da dieses den größten Überschuß an Essigsäureanhydrid benötigt, seine Konzentration im Plasma aber nur etwa $^1/_{400}$ der des Cortisols beträgt.

Nach Vorliegen dieser Ergebnisse führen wir die Acetylierung der Corticosteroide nach folgenden Gesichtspunkten durch:

Die Eluate des Papierchromatogramms werden in Röhrchen, die unten in einer Spitze auslaufen, im Vakuum zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird gut getrocknet und in 0,02 ml absolutem Pyridin gelöst. Darauf werden etwa 0,01 ml ^{3}H-Essigsäureanhydrid in 1- oder $10^0/_0$iger Lösung in absolutem Benzol zugesetzt. Nach 20stündiger Reaktionsdauer wird der Überschuß mit 0,3 ml Wasser hydrolisiert und das Acetat mit 4 ml Dichlormethan extrahiert. Der Extrakt wird mit 0,8 ml Wasser gewaschen und zur Trockne eingedampft. Die Reinigung erfolgt

durch zweimalige Papierchromatographie in dem von PETERSON u. Mitarb.[3,8] angegebenen System Cyclohexan-Benzol-Methanol-Wasser (4:2:4:1). Das Steroid

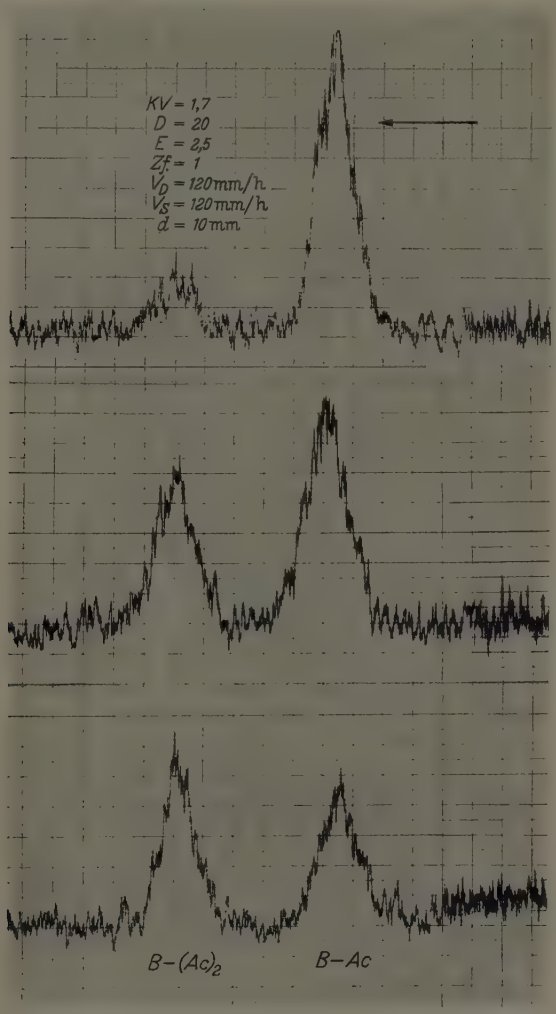


Abb. 1. Radiopapierchromatogramm von Corticosteronmono- und -diacetat

wird nach Zugabe von 3 μg inaktivem Acetat vor der Papierchromatographie durch Photographie im UV fixiert.

Wie sich gezeigt hat, ist nach der zweiten papierchromatographischen Trennung das Verhältnis $^{14}C/^{3}H$ konstant. Das Eluat des zweiten Papierchromatogramms wird in vacuo in einem Bombenrohr eingedampft.

Nach Zugabe von einigen Milligramm Bernsteinsäure als Träger und der 8fachen Menge $KClO_4$ wird die Bombe nach Vorschrift von Simon u. Mitarb.[6] unter Vakuum abgeschmolzen und 40 min auf 650° C erhitzt. Nach beendeter Oxydation werden CO_2 und H_2O mit flüssiger Luft im unteren Ende der Bombe ausgefroren und die Bombe oben geöffnet. Nachdem sie mit Aceton-Trockeneis auf — 75° C erwärmt wurde, wird das CO_2 über einen Schlauch in die Vakuumapparatur gepumpt und in einer Falle mit flüssiger Luft ausgefroren. Anschließend wird es in ein Gasfüllzählrohr überführt.

Dem in der Bombe ausgefrorenen Wasser wird amalgamiertes Zink zugesetzt und die Bombe unter Vakuum abgeschmolzen.

Die Reduktion zu Wasserstoff und Tritium erfolgt innerhalb von 20 min bei 650° C. Die Bombe wird in einer zweiten Vakuumapparatur geöffnet und $^{14}CO_2$ und HTO in ein Füllzählrohr überführt. Die Zählrohre werden mit Methan auf Atmosphärendruck aufgefüllt und über einen Vorverstärker an das Strahlungsmeßgerät* angeschlossen.

Im Gegensatz zu dem bisherigen Vorgehen[3,5,8], haben wir die spezifische Radioaktivität des ^{3}H-Essigsäureanhydrids bestimmt, indem wir Proben von 4-^{14}C-Cortisol und -Corticosteron acetyliert und durch zweimalige Papierchromatographie gereinigt haben. Die spezifische Aktivität wurde aus den Impulsraten von ^{14}C und ^{3}H berechnet. Bei der Bestimmung von Aldosteron mußte die Methode eine Variante erfahren, da ^{14}C-Aldosteron noch nicht verfügbar ist. Man bereitet sich aus Aldosteron und ^{14}C-Essigsäureanhydrid das ^{14}C-Diacetat und setzt dies in bestimmter Menge dem acetylierten Plasmaextrakt zu. Man kann so den Verlust von der Acetylierung ab bestimmen. Der Verlust vor der Acetylierung wird durch Paralleltest mit [16-^{3}H]-Aldosteron ermittelt.

Die Methode ist prinzipiell für alle Corticosteroide — auch nebeneinander — anwendbar. Die untere Nachweisgrenze beträgt etwa 0,005 μg.

Die vorliegende Arbeit wurde durch eine Sachbeihilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert.

Literatur

[1] Ayres, P. J., O. Garrod, S. A. Simpson u. J. F. Tait: Biochemic. J. **65**, 639 (1957); vgl. diese Z. **160**, 230 (1958). — [2] Bush, I. E.: Biochemic. J. **50**, 370 (1952); vgl. diese Z. **137**, 440 (1952/53). — [3] Kliman, B., u. R. E. Peterson: J. biol. Chemistry **235**, 1639 (1960). — [4] Peterson, R. E.: J. biol. Chemistry **225**, 25 (1957); vgl. diese Z. **162**, 318 (1958). — [5] Schedl, H. P., u. Mitarb.: J. clin. Endocrin. Metabol. **19**, 1223 (1959). — [6] Simon, H., H. Daniel u. J. F. Klebe: Angew. Chem. **71**, 303 (1959); vgl. diese Z. **175**, 63 (1960). — [7] Simpson, S. A., J. F. Tait, A. Wettstein, R. Neher, J. v. Euw, O. Schindler u. T. Reichstein: Helv. chim. Acta **37**, 1163, 1200 (1954). — [8] Yankopoulos, N. A., J. O. Davis, B. Kliman u. R. E. Peterson: J. clin. Invest. **38**, 1278 (1959).

Organisch-Chemisches Institut der Technischen Hochschule und I. Medizinische Klinik der Universität, München 15, Ziemssenstr. 1a

* FH 90, FH 902, KA 1807 und FHK 1/505, Hersteller Frieseke u. Hoepfner, Erlangen-Bruck.

Namen- und Sachverzeichnis des 181. Bandes

Namenverzeichnis

([Or] bedeutet Originalabhandlung, [L] Literaturbesprechung)

Ache, H. J., A. Thiemann und W. Herr, Radiogaschromatographische Analyse tritiummarkierter aromatischer Nitro- und Halogenverbindungen 551 [Or]
Adam, H., siehe Schnitger, H.
Anger, V., siehe Feigl, F.
Ashworth, M. R. F., und W. Walisch, Application of Polarovoltric End-Point Determination to Titration of Organic Compounds 193 [Or]

Bässler, L., siehe Bayer, E.
Ballczo, H., Die besten Möglichkeiten zur Fluorbestimmung organischer Verbindungen 110 [Or]
Bartscher, W., siehe Schmidts, W.
Bayer, E., Aussprache zum Vortrag „Zusammenhänge zwischen Struktur und gaschromatographischen Daten organischer Verbindungen" 366
Bayer, E., und L. Bässler, Systematische Identifizierung von Estern im Weinaroma. II. Mitteilung zur systematischen Identifizierung verdampfbarer organischer Substanzen 418 [Or]
Bayer, E., G. Wahl und H. G. Witsch, Präparative Gaschromatographie II. Mitteilung 384 [Or]
Belcher, R., Sub-micro Methods for the Analysis of Organic Compounds 22 [Or]
Bergmann, G., H. Spieker und F. Zöhrer, Quantitative Mehrkomponentenanalysen. II. IR- und UV-Chromatographie 313 [Or]
Billek, G., siehe Kratzl, K.
Bland, D. E., siehe Kratzl, K.
Bober, H., siehe Götz, A.
Braunitzer, G., Die Ermittlung der Konstitution einer klassischen Peptidkette 514 [Or]
Büchel, K. H., siehe Weitkamp, H.
Bücher, T., siehe Schnitger, H.

Cramer, F., Anwendung der Chromatographie zur Strukturaufklärung von Oligonucleotiden 545 [Or]
Cremer, E., Aussprache zum Vortrag „Zusammenhänge zwischen Struktur und gaschromatographischen Daten organischer Verbindungen" 364
Cruse, K., Analyse organischer Verbindungen nach der Methode der Hochfrequenztitration 180 [Or]
Czok, R., siehe Schnitger, H.

Dahmen, E. A. M. F., siehe Dijkstra, R.
Dannenberg, H., Strukturaufklärung organischer Verbindungen nach chemischen und physikalischen Methoden 425 [Or]
Dijkstra, R., und E. A. M. F. Dahmen, Analyse von Alkylaluminiumverbindungen mit Hilfe der Gaschromatographie 399 [Or]

Eberius, E., Wasserbestimmung in organischen Substanzen mit chemischen Methoden 172 [Or]
Ehrenberger, F., siehe Gorbach, S.
Elias, H., siehe Lieser, K. H.
Endres, H., Chromatographische Untersuchungen von Polyhydroxyphenolen, Chinonen und Hydroxychinonen an Polyamid 331 [Or]
Englert, G., Über einige Molekülstrukturuntersuchungen durch Kernresonanzspektroskopie 447 [Or]

Fasold, H., und F. Turba, Spaltung von Dinitrophenylaminosäuren 539 [Or]
Feigl, F., und V. Anger, Nachweis und Unterscheidung von isomeren organischen Verbindungen mit Hilfe von Tüpfelreaktionen 160 [Or]
Franzen, V., Aufklärung von Reaktionsabläufen mit Hilfe der Protonenresonanz 443 [Or]
Frommhold, K., siehe Schoenemann, K.

Ganse, E., siehe Schnitger, H.
Götz, A., und H. Bober, Eine schnelle Sauerstoffbestimmung in organischen Substanzen 92 [Or]

Gorbach, S., und F. Ehrenberger, Über ein halbautomatisches Titriergerät zur Bestimmung kleiner Mengen Kohlendioxid. Anwendung für die direkte Sauerstoffbestimmung in organischen Substanzen und für die C- und CO_2-Bestimmung in wäßrigen Lösungen 100 [Or]
Gruber, K., siehe Kratzl, K.
Gudbjarnason, S., siehe Lamprecht, W.

Halász, I., und G. Schreyer, Trennleistung und Bodenzahlen bei gaschromatographischen Analysen mit Capillarkolonnen 367 [Or]. — Aufbau und Arbeitsweise eines Capillarchromatographiegerätes mit Flammenionisationsdetektor für quantitative Analysen 384 [Or]
Halász, I., und E. E. Wegner, Flüssigkeitsbedecktes aktives Aluminiumoxid als stationäre Phase in der Gaschromatographie 382 [Or]
Hannig, K., Die trägerfreie kontinuierliche Elektrophorese und ihre Anwendung 244 [Or]
Hartmann, H., J. Heidberg, J. Heintges und H. Jung, Analytische Probleme bei kinetischen Untersuchungen über die Spaltung von Di- und Tripeptiden 533 [Or]
Hecker, E., Neuere Entwicklungen und Ergebnisse der Substanztrennung durch multiplikative Verteilung 284 [Or]. — Aussprache zum Vortrag „Zusammenhänge zwischen Struktur und gaschromatographischen Daten organischer Verbindungen" 366
Heidberg, J., siehe Hartmann, H.
Heintges, J., siehe Hartmann, H.
Herr, W., siehe Ache, H. J.
Herrmann, M., Über die Brombestimmung durch Röntgenfluorescenzanalyse 122 [Or]
Hesse, G., Chromatographische Verfahren in der organischen Chemie 274 [Or]
Hoverath, A., siehe Radmacher, W.
Huber, W., Die potentiometrische Titration von primären, sekundären und tertiären aliphatischen und aromatischen Aminen nebeneinander 158 [Or]

Irion, W., siehe Schultze, G. R.

Jeschek, G., siehe Schoenemann, K.
Jung, H., siehe Hartmann, H.

Karl, J., siehe Ködding, R.
Katzlmeier, H., siehe Lamprecht, W.
Keulemans, A. I. M., Der heutige Stand der Gaschromatographie — eine Übersicht 350 [Or]
Kienitz, H., siehe Riedel, O.
Kimmer, W., siehe Schmalz, E. O.
Kirchner, P., siehe Weygand, F.
Kirsten, W. J., Einige Dezimilligramm- und Ultramikromethoden im Routine-Elementaranalysenlaboratorium 1 [Or]
Koczorek, Kh. R., siehe Ködding, R.
Ködding, R., W. Lamprecht, H. P. Wolf, J. Karl und Kh. R. Koczorek, Bestimmung von Corticosteroiden im Blut durch Doppelmarkierung und Messung von ^{14}C und ^{3}H in der Gasphase 574 [Or]
Kolb, B., siehe Weygand, F.
Korte, F., siehe Weitkamp, H.
Kováts, E. sz., Zusammenhänge zwischen Struktur und gaschromatographischen Daten organischer Verbindungen 351 [Or]. — Aussprache zum Vortrag „Zusammenhänge zwischen Struktur und gaschromatographischen Daten organischer Verbindungen" 364
Kratky, O., Messung der Absolutintensität der Röntgenkleinwinkelstreuung von Kolloidteilchen und Makromolekülen zur Bestimmung ihrer Größe und Gestalt 480 [Or]
Kratzl, K., G. Billek, G. Puschmann, H. Simon, K. Gruber und D. E. Bland, Radiochemische und gaschromatographische Methoden zum Studium der reversiblen Alkoxylierung und Alkylierung 550 [Or]
Kresze, G., und V. Schmidt, Anwendung von Trifluoressigsäure bei der Analyse von Aminosäuren und Peptiden 527 [Or]
Kuhn, M., und R. Mecke, Zur Existenz des 1,2,3,4-Thiatriazol-Ringgerüstes. 1. Mitteilung über die Umsetzung von Thiosemicarbaziden mit salpetriger Säure 487 [Or]

Läufer, S., Über die IR-Absorption von Purinkörpern im Bereich 15 bis 20 μ 481 [Or]
Läufer, S., und F. Lingens, Über Kondensationsprodukte aromatischer Amine mit Hydroxyaldehyde 494 [Or]
Lamprecht, W., S. Gudbjarnason und H. Katzlmeier, Messung und Differenzierung katalytischer Wasserstoff-

wellen bei der Polarographie von Sulfhydryl- und Disulfidverbindungen 201 [Or]
Lamprecht, W., und H. Katzlmeier, Polarographie schwefelhaltiger Proteine 216 [Or] — Siehe auch Ködding, R., sowie Schäfer, G.
Lieser, K. H., und H. Elias, Radiopapierchromatographie der Isomeren des 1,2,3,4,5,6-Hexachlor-cyclohexans (HCH) 560 [Or]
Lingens, F., siehe Läufer, S.

Malissa, H., Ein Beitrag zur Automatisierung in der Mikroelementaranalyse 39 [Or]
Mecke, R., siehe Kuhn, M.
Merz, W., Beitrag zur Mikrobestimmung des aktiven Wasserstoffs 147 [Or]
Müller, K., Die Bestimmung der Kohlenstoff-Mehrfachbindung 126 [Or]
Müllhofer, G., siehe Simon, H.
Mutschler, E., siehe Teichert, K.

Niemann, A., Über die Hydrolyse der Peptidbindung 543 [Or]

Papenberg, K., siehe Schnitger, H.
Puschmann, G., siehe Kratzl, K.

Radmacher, W., und A. Hoverath, Vereinfachtes Verfahren zur Bestimmung des Kohlenstoffs und Wasserstoffs sowie des Schwefels organischer Substanzen 77 [Or]
Riedel, O., und H. Kienitz, Die Bildung von Terephthalat durch Carboxylgruppenumlagerung in einer $^{14}CO_2$-Atmosphäre 567 [Or]
Rochelmeyer, H., siehe Teichert, K.
Rösler, H., siehe Rotzsche, H.
Rotzsche, H., und H. Rösler, Über Silicone LI. Gaschromatographische Untersuchungen an Methylhydrocyclosiloxanen 407 [Or]

Salzer, F., Ein Mikroschnellverbrennungsautomat zur Bestimmung von Kohlenstoff und Wasserstoff in organischen Stoffen 59 [Or]
Schäfer, G., W. Lamprecht und K. Stuhlfauth, Nachweis und Verteilung von Sulfanilylharnstoffen in Zellstrukturen und Autoradiographie von Gewebeschnitten mit dem tritium-markierten oralen Antidiabeticum 568 [Or]
Scheffler, K., Zur Aufklärung mesomerer Strukturen organischer Radikale durch Elektronenresonanz 456 [Or]
Schildknecht, H., Normales Erstarren, Zonenschmelzen und Kolonnenkristallisieren. Neue Methoden des fraktionierten Kristallisierens aus der Schmelze 254 [Or]
Schmalz, E. O., und W. Kimmer, Beitrag zur infrarotspektroskopischen Simultananalyse. II. Mitteilung 229 [Or]
Schmidt, V., siehe Kresze, G.
Schmidts, W., und W. Bartscher, Grundlagen der konduktometrischen Kohlenstoffbestimmung 54 [Or]
Schnitger, H., Geräte zur Ionenaustausch-Chromatographie im Mikromaßstab 324 [Or]
Schnitger, H., K. Papenberg, E. Ganse, R. Czok, T. Bücher und H. Adam, Chromatographie phosphathaltiger Metabolite eines menschlichen Leberpunktats 324
Schoenemann, K., G. Jeschek und K. Frommhold, Eine Methode zur quantitativen papierchromatographischen Bestimmung von Zuckern und Zuckeralkoholen 338 [Or]
Schöniger, W., Die Kolbenmethode in der organischen Mikroelementaranalyse 28 [Or]
Schreyer, G., siehe Halász, I.
Schultze, G. R., und W. Irion, Polarographische Bestimmung von Schwefel und schwefelhaltigen Verbindungen in Erdöl und Erdölprodukten sowie von metallischem Abrieb in Altölen 200 [Or]
Schulz, G., Anwendungsbeispiele der Gaschromatographie in der industriellen Praxis 390 [Or]
Simon, H., und G. Müllhofer, Manometrisches Verfahren zur C-H-Analyse mit Einwaagen ab 0,3 Milligramm 85 [Or]. — Siehe auch Kratzl, K.
Spieker, H., siehe Bergmann, G.
Stahl, E., Dünnschicht-Chromatographie (Thin-layer-Chromatography, Chromatographie sur couches minces) 303 [Or]
Stenhagen, E., Massenspektrometrie als Hilfsmittel bei der Strukturbestimmung organischer Verbindungen, besonders bei Lipiden und Peptiden 462 [Or]
Stuhlfauth, K., siehe Schäfer, G.

Teichert, K., E. Mutschler und H. Rochelmeyer, Die plattenchromatographische Untersuchung von Naturstoffgemischen 325 [Or]
Thiemann, A., siehe Ache, H. J.
Turba, F., siehe Fasold, H.

Wahl, G., siehe Bayer, E.
Walisch, W., siehe Ashworth, M. R. F.
Wegner, E. E., siehe Halász, I.
Weitkamp, H., K. H. Büchel, F. Wiese und F. Korte, Beispiele zur Strukturbestimmung organischer Verbindungen durch Kerninduktionsspektroskopie 455 [Or]
Weygand, F., B. Kolb und P. Kirchner, Gaschromatographische Trennung von N-Trifluoracetyl-dipeptidmethylestern. II. Mitteilung 396 [Or]
Wiese, F., siehe Weitkamp, H.
Witsch, H. G., siehe Bayer, E.
Wolf, H. P., siehe Ködding, R.

Ziechmann, W., Gewinnung, Auftrennung und Charakterisierung von Huminsäuren 503 [Or]
Zöhrer, F., siehe Bergmann, G.

Sachverzeichnis

(Die Salze sind bei den betreffenden Metallen zu suchen.

Die mit [L] bezeichneten Stellen sind Literaturbesprechungen)

Abrieb, Bestimmung in Altölen 200
Abwasser, Bestimmung von Carbonat 108
Acetanilid, Analyse 16, 106; Bestimmung des aktiven Wasserstoffes 155; von Sauerstoff 96
Acetessigester, Bestimmung des aktiven Wasserstoffes 155
Aceton, Untersuchung 70; Bestimmung von Carbonat in wäßriger Lösung 108
Acetylaceton, Bestimmung des aktiven Wasserstoffes 155
Acetylchlorid, zur Wasserbestimmung 176
Acetylsalicylsäure, Analyse 106
Acrolein, Bestimmung der Doppelbindungen 132, 140
Acrylamid, Bestimmung der Doppelbindungen 140
Acrylnitril, Bestimmung der Doppelbindungen 132, 140
Acrylsäure, Bestimmung der Doppelbindungen 132, 140
Acrylsäureäthylester, Bestimmung der Doppelbindungen 140
Acrylsäurebutylester, Bestimmung der Doppelbindungen 132
Acrylsäuremethylester, Bestimmung der Doppelbindungen 140
Ätherische Öle, Trennung durch Dünnschicht-Chromatographie 308
Äthinylcyclohexanol, Hydrierung 145
2-Äthoxy-4-methyl-2,3-dihydropyran, Bestimmung der Doppelbindungen 132
Aglukone, Trennung durch Dünnschicht-Chromatographie 309
Alanin, Elektrophorese 537
α-Alanin, Bestimmung des aktiven Wasserstoffes 155
DNP-Alanin, Spaltung 541
N-TFA-L-Alanyl-L-alaninmethylester, Massenspektrum 478
N-TFA-L-Alanylglycerinmethylester, Massenspektrum 474
N-TFA-L-Alanyl-L-phenylalaninmethylester, Massenspektrum 476
DL-Alanyl-DL-serin, Elektrophorese 537
O-(DL-Alanyl)-DL-serin, Elektrophorese 537
N-TFA-L-Alanyl-L-serinmethylester, Massenspektrum 478
Albumin, Untersuchung durch Verteilung im Serum 294
Alkaloide, dünnschichtchromatographische Untersuchung 308, 326
Alkan-Wasserstoff-Verhältnis, Bestimmung 406
Alkohol X-acetat, Retentionsindex an Apiezon-L und -Emulphor-O 357
Alkoxylgruppen, Bestimmung 27
Alkoxylierung, radiochemische und gaschromatographische Untersuchung 550
Alkylaluminiumverbindungen, gaschromatographische Untersuchung 399
Alkylierung, radiochemische und gaschromatographische Untersuchung 550
Allylalkohol, Bestimmung der Doppelbindungen 132; des aktiven Wasserstoffes 156
Altöle, Bestimmung von metallischem Abrieb 200

Aluminiumalkylverbindungen, gaschromatographische Untersuchung 399
Aluminium(III)-chlorid, zur Wasserbestimmung 177
Aluminiumoxid, flüssigkeitsbedecktes Al_2O_3 als stationäre Phase in der Gaschromatographie 382
Ameisensäureäthylester, Identifizierung 421; Gehalt in Wein 422
Amine, Bestimmung von primären, sekundären und tertiären aliphatischen und aromatischen Aminen nebeneinander 158; Trennung durch Dünnschicht-Chromatographie 308
o-Amino-acetophenon, Kondensationsprodukt mit Glykolaldehyd 498
Aminobenzoesäure, Untersuchung 70
p-Aminobenzoesäure, Bestimmung des aktiven Wasserstoffes 155
o-Aminobenzonitril, Kondensationsprodukt mit Glykolaldehyd 498
4-Amino-5-bromo-4-methylpyrimidin, Bestimmung von Stickstoff 8
m-Aminophenol, Bestimmung 195
Aminophenole, Unterscheidung 167
Aminosäuremethylester, Massenspektren 472; Bestimmung 393
Aminosäuren, Spaltung von Dinitrophenyl-aminosäuren 539; Massenspektren der N-TFA-Verbindungen 473; Analyse mit Trifluoressigsäure 527; Trennung durch Dünnschichtchromatographie 308; elektrophoretische Trennung 250
Ammoniumphosphat, Bestimmung von Phosphor 10
Analyse, quantitative Mehrkomponentenanalysen 313
Anilin, Kondensationsprodukt mit Glykolaldehyd 498; Bestimmung des aktiven Wasserstoffes 155
Anisol, Untersuchung 415
Anthranilsäure, Kondensationsprodukte mit Zuckern 496
Anthranilsäuremethylester, Kondensationsprodukte mit Zuckern 496; Kondensationsprodukt mit Glykolaldehyd 498
Antidiabeticum, Autoradiographie von tritium-markiertem Antidiabeticum 568
Antimon(III)-chlorid, zur Wasserbestimmung 177
Antioxydantien, Trennung durch Dünnschicht-Chromatographie 308
Apiezon-L, Retentionsindex von Limonen an Apiezon-L 356; Retentionsindices verschiedener Ester der Essigsäure an Apiezon-L 357
Arabinose, Kondensationsprodukt mit Anthranilsäure 496
Arginin-vasopressin, Untersuchung durch Verteilung 292
Aromatengemische, chromatographische Untersuchung 321
Aromatische Amine, Kondensationsprodukte mit Hydroxyaldehyden 494; mit Glykolaldehyd 498; mit Methoxyacetaldehyd 501
Arsen, Bestimmung in organischen Verbindungen 26
Arsen(III)-chlorid, zur Wasserbestimmung 177
Arzneimittel, Trennung durch Dünnschicht-Chromatographie 308
DNP-Asparaginsäure, Spaltung 541
Aussprache, zum Vortrag von E. Kováts, Zusammenhänge zwischen Struktur und gaschromatographischen Daten organischer Verbindungen 364
Azaserin, Struktur 431
Azobenzol, Untersuchung 70
Azulene, Trennung durch Dünnschicht-Chromatographie 308

Balsame, Trennung durch Dünnschicht-Chromatographie 308
Behenamid, Bestimmung von Stickstoff 8
1,4-Benzochinon, Farbänderung an Polyamid 334; R_f-Wert 335
Benzoesäure, Analyse 16, 106; Untersuchung 70; Bestimmung der Doppelbindungen 140; des aktiven Wasserstoffes 155; von C und H 81
Benzofurazan, Protonenresonanzspektrum 454
Benzofuroxan, Protonenresonanzspektrum 454
Benzol, Untersuchung 70; Bestimmung der Doppelbindungen 140
Benzolhomologen, chromatographische Untersuchung 321
Bernsteinsäure, Analyse 89, 90; Bestimmung von Sauerstoff 96
Blattpigmente, Trennung durch Dünnschicht-Chromatographie 308
Blut, Bestimmung von Corticosteroiden 574
Bodenzahlen, bei gaschromatographischen Analysen mit Capillarkolonnen 367
Brom, Bestimmung durch Röntgenfluorescenzanalyse 122; Bestimmung in organischen Verbindungen 25, 33
Bromacetophenone, Unterscheidung 162
n-1-Brombehensäure, Analyse 16

p-Brombenzhydrazid, Bestimmung 196
Buna, Untersuchung der Isomeren 237
n-Butan, gaschromatographische Abtrennung 370
Butanol-(1)-acetat, Retentionsindex an Apiezon-L und Emulphor-O 357
Butanole, Bestimmung des aktiven Wasserstoffes 156
Butendiol, Bestimmung der Doppelbindungen 132, 140
Butinalacetal, Untersuchung 70
Butin-2-diol-1,4, Hydrierung 145
Butter, Massenspektrum eines C_{27}-Säuremethylesters 471
Buttersäureester, Gehalt in Wein 422

C_{20}-Säure aus Butter, Massenspektrum des Methylesters 471
Camphen, Bestimmung 363
Capillarchromatographiegerät, Anwendung 384
Capillarkolonnen, Trennleistung und Bodenzahlen in der Gaschromatographie 367
Capsaicin, dünnschichtchromatographische Bestimmung 330
Carbaminsäure-azid, IR-Spektrum 492
Carbazol, Bestimmung des aktiven Wasserstoffes 155
β-[N-o-Carbomethoxyphenylamino]-vinyläther, Kondensationsprodukt mit Methoxyacetaldehyd 501
Carbonat, Bestimmung in starken Laugen, Kochsalzsolen und anderen wäßrigen Lösungen 107
Carbonsäureester, Gehalt in Wein 422
Carbonsäuren, Gehalt in Wein 422
Carboxylgruppen, Bestimmung 27
β-[N-o-Carboxyphenylamino]-vinyläther, Kondensationsprodukt mit Methoxyacetaldehyd 501
Carotine, Trennung durch Dünnschicht-Chromatographie 308
Carvacrol, Bestimmung 363
Carvon, Bestimmung 363
Cetyl-pyridiniumchlorid, Bestimmung 198
Cetyl-trimethyl-ammoniumchlorid, Bestimmung 198
Chemische Methoden, zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen 425
Chinolin, Unterscheidung von Isochinolin 164
Chinone, chromatographische Trennung 331
Chlor, Bestimmung in organischen Verbindungen 25, 33
p-Chloracetanilid, Analyse 90
Chlor-Alkalielektrolyse, Bestimmung von Carbonat in Lösungen 109
o-Chlorbenzoesäure, Analyse 16
Chlorbenzol, Bestimmung von C und H 81
3-Chlor-6-benzoylphenol, Untersuchung 71
Chlordinitrobenzol, Analyse 16
p-Chlormercuribenzoat, Umsetzung mit Sulfhydrylgruppen 209
p-Chlornitrobenzol, Nachweis 168
Cholesterinester, Trennung durch Dünnschicht-Chromatographie 308
Chromatographie, Anwendung der IR- und UV-Chromatographie 313; Anwendungen und Theorie der Dünnschicht-Chromatographie 303; Anwendung in der organischen Chemie 274; plattenchromatographische Untersuchung von Naturstoffgemischen 325; Verwendung zur Untersuchung von Polyhydroxyphenolen, Chinonen und Hydroxychinonen 331; zur Strukturaufklärung von Oligonucleotiden 545; Geräte zur Ionenaustausch-Chromatographie im Mikromaßstab 324
Chromatographie sur couches minces, Theorie und Anwendungen 303
Cineole, Bestimmung 363
Coffein, IR-Spektrum 484
Corticosteroide, Bestimmung im Blut 574
Crotonaldehyd, Bestimmung der Doppelbindungen 132
Crotonsäure, Bestimmung der Doppelbindungen 132, 140
Cyanacetamid, Bestimmung von Stickstoff 8
Cyclosiloxane, Siedepunkte 412
p-Cymol, Bestimmung 363
DNP-Cysteinsulfonsäure, Spaltung 541
Cystin, Bestimmung von Stickstoff 8
Cytochrom c, Untersuchung durch Verteilung 296

Decamethylcyclohexasiloxan, Untersuchung 415
Decamethylcyclopentasiloxan, Untersuchung 415
Decanol-(1), Retentionsindex 362
2-cis-4-trans-Dehydrogermaniumsäuremethylester, Protonenresonanzspektrum 450
2-Desoxy-d-glucose, Kondensationsprodukt mit Anthranilsäure 496
Detektor, Anwendung des Flammenionisationsdetektors 384
Diäthyläther, Untersuchung 70

Diäthylaluminiumchlorid, Analyse 406
Diäthylbenzole, infrarotspektroskopische Bestimmung von m- neben p-Diäthylbenzol 233
Diäthylbromid-hexahydrobrenzcatechin, Untersuchung 71
Diallylsulfid, Bestimmung von Schwefel 83
2,6-Dichlor-4-hexylphenol, Untersuchung 71
2,4-Dichlor-6-nitrophenol, Untersuchung 71
4,4-Dideuteroeicosansäure, Massenspektrum des Methylesters 467
Digitalis, Trennung der Glykoside durch Dünnschicht-Chromatographie 309
Dihydromuconsäuredinitril, Bestimmung der Doppelbindungen 132
5,8-Dihydro-naphthochinon(1,4), R_f-Wert 335
Dihydroxyaceton, Messung und Differenzierung von Wasserstoffwellen 204
2,2′-Dihydroxyazobenzol, R_f-Wert 335; chromatographische Bestimmung 333
4,4′-Dihydroxyazobenzol, chromatographische Bestimmung 333
2,2′-Dihydroxy-benzophenon, R_f-Wert 335; chromatographische Bestimmung 333
2,4-Dihydroxy-benzophenon, R_f-Wert 336
4,4′-Dihydroxybenzophenon, chromatographische Bestimmung 333
4,4′-Dihydroxydiphenyl, chromatographische Bestimmung 332
2,4-Dihydroxy-diphenylmethan, R_f-Wert 336
4,4′-Dihydroxy-diphenylsulfon, R_f-Wert 336
4,4-Dihydroxy-stilben, R_f-Wert 336
Diisobutylen, Bestimmung der Doppelbindungen 140
Dimedon, Untersuchung 70
Dimer-dithioacetylaceton, Analyse 16
Dimethylaminobenzylidenrhodanin, Bestimmung von C und H 81
Dimethylfurazan, Protonenresonanzspektrum 453
Dimethylfuroxan, Protonenresonanzspektrum 453
Dimethylglyoxim, Untersuchung 70
2,5-Dimethylhexin-3-diol-2,5, Hydrierung 145
3,6-Dimethyloctin-4-diol-3,6, Hydrierung 145
α,p-Dimethylstyrol, Bestimmung 363
Dimethyl-thiosemicarbazide, Protonenresonanzspektren 448
3,5-Dinitrobenzoesäure, Untersuchung 70
Dinitrophenyl-aminosäuren, Spaltung 539
2,4-Dinitrophenylhydrazin, Bestimmung 196
Dipeptide, analytische Probleme bei der Spaltung 533
N-TFA-Dipeptidmethylester, Gaschromatogramm 477
Diphenylamin, Untersuchung 70
Disulfid-Proteine, polarographische Untersuchung 216
Disulfidverbindungen, Messung und Differenzierung katalytischer Wasserstoffwellen 201
2,6-Di-tert.-butyl-4-cyanophenoxyl, Elektronenresonanzspektrum 460
2,6-Di-tert.-butyl-4-diphenylmethylphenoxyl, Elektronenresonanzspektrum 460
2,6-Di-tert.-butyl-4-methoxyl-phenoxyl, Elektronenresonanzspektrum 461
2,6-Di-tert.-butyl-4-phenyl-phenoxyl, Elektronenresonanzspektrum 461
Dodecamethyl-cyclohexasiloxan, Untersuchung 415
Dodecylmercaptan, Bestimmung des aktiven Wasserstoffes 156
Dünnschicht-Chromatographie, Theorie und Anwendungen 303; zur Untersuchung von Naturstoffen 326

E 605, Abtrennung durch Dünnschicht-Chromatographie 309
n-Eicosan, Massenspektrum 463
Elektrolyse, Bestimmung von Carbonat in Lösungen der Chlor-Alkalielektrolyse 109
Elektronenresonanz, zur Aufklärung mesomerer Strukturen organischer Radikale 456
Elektrophorese, trägerfreie kontinuierliche Elektrophorese und ihre Anwendung 244
Elementaranalyse, Dezimilligramm- und Ultramikromethoden 1; Submikromethoden 22; Automatisierung der Mikroelementaranalyse 39; Verwendung der Kolbenmethode in der Mikroelementaranalyse 28; Bestimmung des aktiven Wasserstoffs 147; Grundlagen der konduktometrischen Kohlenstoffbestimmung 54; Bestimmung von C und H 59; manometrische C-H-Bestimmung 85; Bestimmung von C, H und S 77; von C und O 100; schnelle Sauerstoffbestimmung in organischen Substanzen 92; Bestimmung von Fluor in organischen

Substanzen 110; von Brom durch Röntgenfluorescenzanalyse 122
Emulphor-O, Retentionsindices verschiedener Ester der Essigsäure an Emulphor-O 357; Retentionsindex von Limonen an Emulphor-O 356
Enolase, Untersuchung durch Verteilung 296
Erdöl, Bestimmung von Schwefel und Schwefelverbindungen 200
Erstarren, normales Erstarren 254
Erythrocyten, elektrophoretische Auftrennung von Erythrocyten verschiedener Herkunft 251
Essigsäureäthylester, Untersuchung 70; Identifizierung 421
Essigsäure-n-amylester, Identifizierung 421
Essigsäureester, Gehalt in Wein 422
Ester, Gehalte in verschiedenen Weinen 422; Identifizierung in Weinaroma 418
Eugenol, Unterscheidung von Isoeugenol 161

Farbstoffe, elektrophoretische Trennung 250
Fette, Trennung durch Dünnschicht-Chromatographie pflanzlicher und tierischer Fette 308
Fettfarbstoffe, Trennung durch Dünnschicht-Chromatographie 308
Fibrinogen, Untersuchung durch Verteilung 296
Flammenionisationsdetektor 384
Fluor, Bestimmung in organischen Verbindungen 26, 34, 110
Fumarase, Untersuchung durch Verteilung 296
Fumarsäure, Bestimmung der Doppelbindungen 132, 140
Funktionelle Gruppen, Bestimmung 27
Furfurol, Retentionsindex 362

Gallussäure, Bestimmung 195
Gaschromatographie, heutiger Stand 350; Zusammenhänge zwischen Struktur und gaschromatographischen Daten organischer Verbindungen 351; Trennleistung und Bodenzahlen bei gaschromatographischen Analysen mit Capillarkolonnen 367; Capillarchromatographiegerät mit Flammenionisationsdetektor 384; flüssigkeitsbedecktes Aluminiumoxid als stationäre Phase 382; Anwendung in der industriellen Praxis 390; präparative Gaschromatographie 384; Anwendung zur Untersuchung von Alkylaluminiumverbindungen 399
Gehirnlipoide, Trennung durch Dünnschicht-Chromatographie 309
Gewebsschnitte, Autoradiographie von oralen Antidiabeticum 568
Globin, Untersuchung durch Verteilung 294
γ-Globulin, Untersuchung durch Verteilung 296
D-Glucose, Kondensationsprodukt mit Anthranilsäuremethylester 496
Glutaminsäure-melanotropin, Untersuchung durch Verteilung 292
Glutathion, Messung und Differenzierung katalytischer Wasserstoffwellen 203
Glycerinaldehyd, Messung und Differenzierung von Wasserstoffwellen 204
Glycin, Elektrophorese 537
Glycyl-DL-alanin, Elektrophorese 537
N-TFA-Glycyl-L-alaninmethylester, Massenspektrum 474
Glycyl-DL-alanyl-DL-serin, Elektrophorese 537
N-TFA-Glycylglycinmethylester, Massenspektrum 473
N-TFA-Glycyl-L-isoleucinmethylester, Massenspektrum 475
N-TFA-Glycyl-L-Leucinmethylester, Massenspektrum 475
Glycyl-DL-Serin, Elektrophorese 537
N-TFA-Glycyl-L-valinmethylester, Massenspektrum 473
Glykokoll, Elektrophorese 537
Glykolaldehyd, Kondensationsprodukte mit aromatischen Aminen 498
Glykoside, Trennung durch Dünnschicht-Chromatographie 309

H-Säure, Unterscheidung von K-Säure 167
Hämocyanin, Untersuchung durch Verteilung 296
Hämoglobin, Untersuchung durch Verteilung 296
Halogene, Bestimmung 5; neben Schwefel in organischen Verbindungen 35
Halogenverbindungen, Analyse tritiummarkierter aromatischer Halogenverbindungen 551
Harn, Untersuchung auf Steroide 430
Harnsäure, IR-Spektrum 485; Bestimmung 196
Harnstoff, polarographische Untersuchung 228; Bestimmung des aktiven Wasserstoffes 155
Harze, Trennung durch Dünnschicht-Chromatographie 308
HCH, radiopapierchromatographische Trennung der Isomeren 560

Helix pomatia, Untersuchung von Hämocyanin 296
Heptachlordioxan, Untersuchung 71
1,1,3,5,7,9,11-Heptamethylcyclohexasiloxan, Untersuchung 415
Heptamethylcyclopentasiloxan, Untersuchung 414
Heptamethylcyclotetrasiloxan, Siedepunkt 412; Untersuchung 409, 414
n-Heptan, gaschromatographische Abtrennung 370
1,2,3,4,5,6-Hexachlor-cyclohexan, radiopapierchromatographische Trennung der Isomeren 560
Hexadecadiene, Struktur der Isomeren 437
Hexadeuterohexacosan, Massenspektrum 464
2,4,6-2′-4′-6′-Hexahydroxydiphenylmethan, chromatographische Bestimmung 332
1,1,3,5,7,9-Hexamethylcyclopentasiloxan, Untersuchung 414
Hexamethylcyclotetrasiloxan, Siedepunkt 412; Untersuchung 414
Hexamethylcyclotrisiloxan, Untersuchung 407, 414
Hexamethylentetramin, Untersuchung 70
n-Hexan, gaschromatographische Abtrennung 370
α-n-Hexyltridecansäuremethylester, Massenspektrum 470
Histamindiphosphat, Bestimmung von Phosphor 10
Hochfrequenztitration, zur Analyse organischer Verbindungen 180
Humine, Charakterisierung 504
Huminsäure, Gewinnung, Auftrennung und Charakterisierung 503
Huminsäurevorstufen, Charakterisierung 504
Hydrazobenzol, Bestimmung 196
Hydrochinonmonobenzoat, Unterscheidung von Phenylsalicylat 163
Hydroxyaldehyde, Kondensationsprodukte mit aromatischen Aminen 494; Messung und Differenzierung katalytischer Wasserstoffwellen 204
Hydroxychinone, chromatographische Trennung 331
2-Hydroxydiphenyl, chromatographische Bestimmung 332
4-Hydroxydiphenyl, R_f-Wert 336
Hydroxyketone, Messung und Differenzierung katalytischer Wasserstoffwellen 204
2-Hydroxynaphthochinon, Farbveränderung an Polyamid 334; R_f-Wert 335
18-Hydroxy-oestron, Struktur 430
2-Hydroxy-5,6,7,8-tetrahydronaphthochinon(1,4), R_f-Wert 335
2-Hydroxy-3-vinylphenyl-1,4-naphthochinon, Farbveränderung an Polyamid 334
2-Hydroxy-3-vinylphenyl-naphthochinon(1,4), R_f-Wert 335

Inden, Bestimmung 390
Industrie, Anwendung der Gaschromatographie 390
Infrarotanalyse, Anwendung auf isomere Gemische 229
Insulin, polarographische Untersuchung 224
Ionenaustausch-Chromatographie, Geräte 324
Isatin, Bestimmung von C und H 81
Isochinolin, Unterscheidung von Chinolin 164
Isoeugenol, Unterscheidung von Eugenol 161
Isomeren, Infrarotspektroskopische Analyse 229; Bestimmung der cis- und trans-Isomeren in Synthesekautschuk 235
Isomyomycin, Struktur 434
p-Isopropylphenol, Bestimmung 363

Jod, Bestimmung in organischen Verbindungen 25, 34

K-Säure, Unterscheidung von H-Säure 167
Kaliumhydrogenphthalat, Analyse 16
Kaninchen, Abtrennung der Erythrocyten 251
Katalase, Untersuchung durch Verteilung 296
Kautschuk, quantitative Bestimmung der cis- und trans-Isomeren in Synthesekautschuk 235
Kerninduktionsspektroskopie, zur Strukturbestimmung organischer Verbindungen 455
Kernresonanzspektroskopie, zur Molekülstrukturuntersuchung 447
2-Ketostearinsäure-methylester, Massenspektrum 472
Kochsalzlösungen, Bestimmung von Carbonat 109
Kochsalzsolen, Bestimmung von Carbonat 107
Kohlendioxid, Bestimmung in wäßrigen Lösungen 100; halbautomatisches Titriergerät zur Bestimmung 100
Kohlenstoff, Bestimmung 26, 77, 100; Mikroschnellbestimmung 59; Grund-

lagen der konduktometrischen Bestimmung 54; manometrische Bestimmung 85; Bestimmung in Thioharnstoff und Sulfanilsäure 51
Kohlenstoff-14, zur Markierung von Corticosteroiden im Blut 574
Kohlenstoff-14-Atmosphäre, zur Bildung von Terephthalat durch Carboxylgruppenumlagerung 567
Kohlenstoff-Mehrfachbindung, Bestimmung 126
Kolbenmethode, in der organischen Mikroelementaranalyse 28
Kolloidteilchen, Röntgenkleinwinkelstreuung zur Untersuchung 480
Kolonnenkristallisieren, Anwendung des Kolonnenkristallisierens 254
m-Kresol, Bestimmung 195
Kresole, Bestimmung 363; Unterscheidung 162; Trennung durch Dünnschicht-Chromatographie 309
Kristallisieren, fraktionierte Kristallisation aus der Schmelze 254
Krylene, Untersuchung der Isomeren 237

Lagosin, Gaschromatogramm der Estermischung 469; Massenspektrum des Methylesters 470
Laugen, Bestimmung von Carbonat 107
Laurinsäure, Analyse 16
Leitungswasser, Bestimmung von Carbonat 108
DNP-Leucin, Spaltung 541
Leucin-corticotropin, Untersuchung durch Verteilung 292
Limonen, Retentionsindex 356; Bestimmung 359, 363
Linalool, Bestimmung der Doppelbindungen 140
Lipoide, Strukturbestimmung 462; Trennung durch Dünnschicht-Chromatographie 308; Trennung von Gehirnlipoiden durch Dünnschicht-Chromatographie 309
Lösungen, Bestimmung von Kohlendioxid in wäßrigen Lösungen 100; von Carbonat 107
DNP-ε-Lysin, Spaltung 541
Lysin-vasopressin, Untersuchung durch Verteilung 292
Lysozym, Untersuchung durch Verteilung 294

Makromoleküle, Röntgenkleinwinkelstreuung zur Untersuchung 480
Makropeptide, Untersuchung durch Verteilung 294
Maleinsäure, Bestimmung der Doppelbindungen 132, 140; des aktiven Wasserstoffes 156
Malonester, Bestimmung des aktiven Wasserstoffes 15
Mannit, Untersuchung 70
Massenspektrometrie, als Hilfsmittel zur Strukturbestimmung organischer Verbindungen 462
Mehrkomponentenanalyse, quantitative Mehrkomponentenanalyse 313
Menschen, Abtrennung der Erythrocyten 251; Untersuchung von Proteinen durch Verteilung 296
$\Delta^{2,3}\Delta^{4,8}$-p-Menthadien, Bestimmung 363
Methacrylamid, Bestimmung der Doppelbindungen 140
Methacrylnitril, Bestimmung der Doppelbindungen 140
Methan, gaschromatographische Abtrennung 370
Methanol, Bestimmung 393
DNP-Methioninsulfon, Spaltung 541
Methoxyacetaldehyd, Kondensationsprodukte mit aromatischen Aminen 501
Methyläther des Phenols, Bestimmung 363
Methylal, Bestimmung 393
5-Methyl-amino-1,2,3,4-thiatriazol, Protonenresonanzspektrum 448
N-Methylgruppen, Bestimmung 27
3-Methylhexin-4-diol-3,6, Hydrierung 145
Methylhydrocyclosiloxane, gaschromatographische Untersuchung 407
Methylindole, Unterscheidung 165
Methylnaphthaline, Bestimmung 390
7-DL-Methyloctadecansäure, Massenspektrum des Methylesters 471
Methylolmethacrylamid, Bestimmung der Doppelbindungen 140
Methylpalmitat, Massenspektrum 465
2-Methylpentin-3-diol-2,5, Hydrierung 145
Methylstearat, Massenspektrum 464
4-Methylthiosemicarbazid, IR-Spektrum 490
Mikroelementaranalyse, Automatisierung 39; Verwendung der Kolbenmethode 28. — Siehe auch Elementaranalyse
Molekülstruktur, Untersuchung durch Kernresonanzspektroskopie 447
Molekulargewicht, Bestimmung nach RAST 27
Monoäthylanilin, Bestimmung des aktiven Wasserstoffes 155

Monomethylanilin, Bestimmung des aktiven Wasserstoffes 155
Morio-Muskat, Estergehalt 422
Myoglobin, Struktur des Moleküls 440
Myomycin, Struktur 434
Myrcen, Bestimmung 363

Naphthalin, Bestimmung 390; Untersuchung 415; Abtrennung 321
Naphthalinsulfonsäuren, Unterscheidung 163
Naphthochinone, Farbveränderung an Polyamid 334; R_f-Werte 335
α-Naphthol, Bestimmung des aktiven Wasserstoffes 156
β-Naphthol, R_f-Wert 336
Naphthole, Unterscheidung 163
Naphtholgelb S, Bestimmung 198
Naphthylphosphinsäuredichlorid, zur Wasserbestimmung 178
α-Naphthylphosphorigsäuredichlorid, zur Wasserbestimmung 178
Naturstoffgemische, plattenchromatographische Untersuchung 325
o-Nitranilin, Kondensationsprodukt mit Glykolaldehyd 498
Nitraniline, Unterscheidung 170
β-[N-o-Nitrilophenylamino]-vinyläther, Kondensationsprodukt mit Methoxyacetaldehyd 501
Nitrobenzaldehyde, Unterscheidung 169
Nitrobenzoesäure, Analyse 16, 90; Bestimmung von Stickstoff 8
Nitrobenzol, Analyse von markiertem Nitrobenzol 557; Bestimmung des aktiven Wasserstoffes 155
Nitron, Bestimmung von C und H 81
o-Nitrophenol, Bestimmung des aktiven Wasserstoffes 155
Nitrophenole, Unterscheidung 169
β-[N-o-Nitrophenylamino]-vinyläther, Kondensationsprodukt mit Methoxyacetaldehyd 501
Nitrophenylhydrazin, Bestimmung von C und H 81
3-Nitrophthalsäure, Bestimmung von Stickstoff 8
Nitrosodiphenylamine, Unterscheidung 168
o-Nitrotoluol, Analyse von markiertem o-Nitrotoluol 555
Nitroverbindungen, Analyse tritiummarkierter aromatischer Nitroverbindungen 551
Nonamethylcyclohexasiloxan, Untersuchung 415
Nonamethylcyclopentasiloxan, Untersuchung 415
n-Nonan, gaschromatographische Abtrennung 370
DL-Norleucin, Massenspektrum des Methylesters 472
18-Nor-oestron, Struktur 430
Nucleinsäuren, Struktur und Bedeutung 545
Nucleotide, Chromatographie 546

Octamethylcyclohexasiloxan, Untersuchung 415
Octamethylcyclopentasiloxan, Untersuchung 414
Octamethylcyclotetrasiloxan, Siedepunkt 412; Untersuchung 407, 414
Octamethyl-tricyclooctadiene, Bildung und Struktur 432
n-Octan, gaschromatographische Abtrennung 370
sec.-Octylalkohol, Bestimmung des aktiven Wasserstoffes 156
Öle, Bestimmung des metallischen Abriebs in Altölen 200
Ölsäure, Bestimmung der Doppelbindungen 140
Oestratrien, Identifizierung 430
Oleylamin, Bestimmung des aktiven Wasserstoffes 155
Oligonucleotide, Strukturaufklärung 545; Papierchromatographie 546; Ionenaustauscherchromatographie 548
Oligopeptide, Untersuchung durch Verteilung 292
Orcin, Bestimmung 195
Organische Chemie, chromatographische Verfahren 274
Organische Radikale, Aufklärung mesomerer Strukturen 456
Organische Substanzen, systematische Identifizierung 418; Submikroanalyse 22; Elementaranalyse 1; Titration zum polarovoltrischen Endpunkt 193; Analyse durch Hochfrequenztitration 180; Bestimmung des aktiven Wasserstoffs 147; manometrische C-H-Analyse 85; Schnellverbrennungsautomat zur Bestimmung von Kohlenstoff und Wasserstoff 59; Bestimmung von C, H und S 77; von Sauerstoff 92, 100; von Fluor 110; von Wasser 172; Strukturaufklärung nach chemischen und physikalischen Methoden 425; Zusammenhang zwischen Struktur und gaschromatographischen Daten 351; massenspektrometrische Strukturbestimmung 462; Strukturbestimmung durch Kerninduktionsspektro-

skopie 455; Nachweis und Unterscheidung von isomeren organischen Verbindungen durch Tüpfelreaktionen 160
Ovalbumin, Untersuchung durch Verteilung 296

Palmitinsäure, Untersuchung 70; Bestimmung des aktiven Wasserstoffes 156
Plamitinsäurechlorid, Bestimmung von Sauerstoff 97
Paprikawirkstoff, dünnschichtchromatographische Untersuchung 330
Paraxanthin, IR-Spektrum 485
Pentaacetylglucose, Analyse 90
1,3,5,7,9-Pentamethylcyclopentasiloxan Untersuchung 414
Pentamethylcyclotetrasiloxan, Siedepunkte 412
1,1,3,5,7-Pentamethylcyclotetrasiloxan, Untersuchung 414
n-Pentan, gaschromatographische Abtrennung 370
Pentanol-(1)-acetat, Retentionsindex an Apiezon- L und Emulphor-O 357
Pepsin, Untersuchung durch Verteilung 296
Peptidbindung, Hydrolyse 543
Peptide, Strukturbestimmung 462; Analyse mit Trifluoressigsäure 527; elektrophoretische Trennung 251; analytische Probleme bei der Spaltung von Di- und Tripeptiden 533; Massenspektren der N-TFA-Verbindungen 473
Peptidkette, Konstitution einer klassischen Peptidkette 514
Peroxide, Trennung organischer Peroxide Dünnschicht-Chromatographie 309
α-Phellandren, Bestimmung 363
Phenacetin, Untersuchung 70
Phenanthren, Abtrennung 321
Phenol, Bestimmung des aktiven Wasserstoffes 156; des Methyläthers 363
Phenoläther, Trennung durch Dünnschicht-Chromatographie 309
Phenole, Trennung durch Dünnschicht-Chromatographie 309
DL-Phenylalanin, Massenspektrum des Methylesters 472
DNP-Phenylalanin, Spaltung 541
N-TFA-L-Phenylalanyl-L-alaninmethylester, Massenspektrum 476
β-[N-Phenylamino]-vinyläther, Kondensationsprodukt mit Methoxyacetaldehyd 501
m-Phenylendiamin, Bestimmung 195
Phenyldiamine, Unterscheidung 166
Phenylhydrazin, Bestimmung 196
5-Phenyl-3-methyl-2,4-pentadienmethylester, Protonenresonanzspektren der cis-trans- und all-trans-Isomeren 451
Phenylsalicylat, Unterscheidung von Hydrochinonmonobenzoat 163
Phenylschwefelsäure, Unterscheidung von Phenolsulfonsäure 164
Phenylsulfonsäure, Unterscheidung von Phenylschwefelsäure 164
Phosphatide, Trennung durch Dünnschicht-Chromatographie 309
Phosphor, Bestimmung in organischen Verbindungen 9, 26, 35
Physikalische Methoden, zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen 425
Pikrinsäure, Bestimmung 198; Untersuchung 70; Bestimmung des aktiven Wasserstoffes 155
Pinen, Bestimmung 363
Plastikator, Untersuchung der Isomeren 237
Podophyllum, Trennung der Glykoside durch Dünnschicht-Chromatographie 309
Polarographie, Messung und Differenzierung katalytischer Wasserstoffwellen 201; schwefelhaltiger Proteine 216
Polarovoltrischer Endpunkt, zur Titration von organischen Substanzen 193
Polyamid, zur Trennung von Polyhydroxyphenolen, Chinonen und Hydroxychinonen 331
Polyhydroxyphenole, chromatographische Trennung 331
Polypeptide, Untersuchung durch Verteilung 292
Polyvinylchlorid, Untersuchung 71
Portugieser, Estergehalt 422
Prolactin, Untersuchung durch Verteilung 294
Propanol-(1)-acetat, Retentionsindex an Apiezon-L und Emulphor-O 357
Propargylalkohol, Hydrierung 145
Propionsäure, Bestimmung des aktiven Wasserstoffes 155
Propionsäureäthylester, Gehalt in Wein 422
Proteine, Isolierung und Charakterisierung 515; Polarographie schwefelhaltiger Proteine 216; schwefelfreier Proteine 220; Trennung der Serumproteine 251
Protonenresonanz, zur Aufklärung von Reaktionsabläufen 443

Pteridinderivate, Trennung durch Dünnschicht-Chromatographie 309
Purin, IR-Spektrum 484
Purinkörper, IR-Absorption 481
Pyramidon, Analyse 90
Pyrethrine, Trennung durch Dünnschicht-Chromatographie 309
Pyrethrinperoxide, Trennung durch Dünnschicht-Chromatographie 309
Pyrogallol, Bestimmung 195

Radikale, Strukturaufklärung durch Elektronenresonanz 456
Reaktionsabläufe, Aufklärung durch Protonenresonanz 443
Resorcin, Bestimmung 195
Ribonuclease, Untersuchung durch Verteilung 294, 296
Ribose, Kondensationsprodukt mit Anthranilsäure sowie mit Anthranilsäuremethylester 496
Riesling, Estergehalt 422
Rinder, Untersuchung der Peptide durch Verteilung 292
Röntgenfluorescenzanalyse, zur Brombestimmung 122
Röntgenkleinwinkelstreuung, Messung an Kolloidteilchen und Makromolekülen 480
Rohrzucker, Bestimmung von C und H 81

Salicylsäure, Bestimmung des aktiven Wasserstoffes 155
C_{20}-Säure aus Butter, Massenspektrum des Methylesters 471
H-Säure, Unterscheidung von K-Säure 167
Sauerstoff, Bestimmung 100; schnelle Bestimmung in organischen Substanzen 92
Schafe, Untersuchung der Peptide durch Verteilung 292
Schmelze, fraktionierte Kristallisation aus der Schmelze 254
Schwangeren-Harn, Untersuchung 430
Schwangerschafts-Frühnachweis, durch Dünnschicht-Chromatographie 309
Schwefel, Bestimmung 1, 25, 34, 77; neben Halogenen in organischen Verbindungen 35; Bestimmung in Erdöl 200; in Thioharnstoff und Sulfanilsäure 51
Schwefelfreie Proteine, polarographische Untersuchung 220
Schwefelhaltige Proteine, polarographische Untersuchung 216
Schwefelhaltige Verbindungen, Bestimmung in Erdöl 200
Schwefelkohlenstoff, Bestimmung von C 81
Schweine, Untersuchung der Peptide durch Verteilung 292
Scilla, Trennung der Glykoside durch Dünnschicht-Chromatographie 309
Serin, Elektrophorese 537; Bestimmung von Stickstoff 8
DNP-Serin, Spaltung 541
Serin-corticotropin, Untersuchung durch Verteilung 292
Serin-melanotropin, Untersuchung durch Verteilung 292
Serum, Trennung der Serumproteine 251; Untersuchung von Albumin durch Verteilung 294
Serumalbumin, Untersuchung durch Verteilung 294, 296
Serumproteine, Trennung 251
DL-Seryl-glycin, Elektrophorese 537
DL-Seryl-glycyl-DL-alamin, Elektrophorese 537
Silicone, Untersuchung 407
Siliconkautschuk, gaschromatographische Untersuchung 407
Steroide, Trennung durch Dünnschicht-Chromatographie 309; Struktur benzoider Steroide 429
Stickstoff, Bestimmung nach DUMAS 6; Bestimmung in organischen Verbindungen 25
Strophanthus, Trennung der Glycoside durch Dünnschicht-Chromatographie 309
Struktur, Aufklärung an organischen Verbindungen 425; Massenspektrometrie als Hilfsmittel zur Strukturbestimmung organischer Verbindungen 462; Untersuchung der Molekülstruktur durch Kernresonanzspektroskopie 447; Bestimmung an organischen Verbindungen durch Kerninduktionsspektroskopie 455; Aufklärung mesomerer Strukturen organischer Radikale 456; an Oligonucleotiden 545
Styrol, Bestimmung der Doppelbindungen 140
Substanzen, Trennung durch multiplikative Verteilung 284
Succinylchlorid, zur Wasserbestimmung 178
Sulfadiazin, Unterscheidung von Sulfapyrazin 165
Sulfanilsäure, Untersuchung 71; Analyse 16; Bestimmung von C und H 81; von C und S 51; von Sauerstoff 97; von Schwefel 83

Sulfanilylharnstoffe, Nachweis und Verteilung 568
Sulfapyrazin, Unterscheidung von Sulfadiazin 165
Sulfhydrylgruppen, Messung und Differenzierung katalytischer Wasserstoffwellen 201; Umsetzung mit Chlormercuribenzoat 209
Sulfhydryl-Proteine, polarographische Untersuchung 217
Sulfonal, Analyse 90
Sulfosalicylsäure, Bestimmung des aktiven Wasserstoffes 155; von Schwefel 83
Synergisten von Pyrethrinen, Trennung durch Dünnschicht-Chromatographie 309
Synthesekautschuk, Bestimmung der cis- und trans-Isomeren 235
Systox, Abtrennung durch Dünnschicht-Chromatographie 309

Tabakmosaikvirus, Modell 441
Taurin, Bestimmung von Stickstoff 8
Teere, Trennung der Bestandteile durch Dünnschicht-Chromatographie 309
Terephthalat, Bildung durch Carboxylgruppenumlagerung 567
Terpinen, Bestimmung 363
Terpineole, Retentionsindices 362
Terpinolen, Bestimmung 359, 363
2,3,4,6-Tetraacetylglucose, Kondensationsprodukt mit Anthranilsäuremethylester 496
Tetrachlordioxan, Untersuchung 71
2,4-2′,4′-Tetrahydroxy-diphenylmethan, chromatographische Bestimmung 332
Tetramethylcyclotetrasiloxan, Siedepunkt 412; Untersuchung 414
Tetrapyrrolderivate, Trennung durch Dünnschicht-Chromatographie 309
Theobromin, IR-Spektrum 485
Theophyllin, IR-Spektrum 485
1,2,3,4-Thiatriazol-Ringgerüst, Existenz 487
Thin-layer-Chromatography, Theorie und Anwendungen 303
Thioacetamid, Bestimmung des aktiven Wasserstoffes 156
Thiocarbaminsäurechlorid, IR-Spektrum 490
Thioharnstoff, Analyse 16, 90; Bestimmung von Kohlenstoff und Schwefel 51
Thionalid, Bestimmung von Schwefel 83
Thionaphthen, Bestimmung 390
Thiophosphorsäureester, Trennung durch Dünnschicht-Chromatographie 309
Thiosemicarbazide, Umsetzung mit salpetriger Säure 487; IR-Spektrum des Umsetzungsproduktes mit salpetriger Säure 489
α-Thujen, Bestimmung 363
Thymol, Bestimmung 363
Titan(IV)-chlorid, zur Wasserbestimmung 177
Toluidine, Kondensationsprodukt mit Glykolaldehyd 498
Toluol, Analyse von markiertem Toluol 552
Toluolsulfochlorid, Untersuchung 71
Toxikologie, Anwendung der Dünnschicht-Chromatographie zur Alkaloidtrennung 308
Traminer, Estergehalt 422
Trennleistung, bei gaschromatographischen Analysen mit Capillarkolonnen 367
Triäthylaluminium, Analyse 406
Tri-n-butylphosphat, Bestimmung von Phosphor 10
Trichlorphenolbenzyläther, Untersuchung 71
Trideuteromethylester der Stearinsäure, Massenspektrum 466
Trideuterostearinsäure, Massenspektrum des Methylesters 466
N-Trifluoracetyl-dipeptid-methylester, gaschromatographische Trennung 396
N-Trifluoracetylverbindungen von Aminosäuren und Peptiden, Massenspektren 473
Trifluoressigsäure, bei der Analyse von Aminosäuren und Peptiden 473, 527
Triisobutylaluminium, Analyse 406
Trijodphenol, Analyse 16
Trikresylphosphat, Bestimmung von Phosphor 10
Trimethylaluminium, Analyse 406
Tripeptide, analytische Probleme bei der Spaltung 533
Triphenylphosphat, Bestimmung von Phosphor 10
Triphenylphosphin, Bestimmung von Phosphor 10
Tripropylaluminium, Analyse 406
2,4,6-Tri-tert.-butyl-phenoxyl, Elektronenresonanzspektrum 458, 459
Tritium, zur Markierung von Corticosteroiden im Blut 574

Undecamethylcyclohexasiloxan, Untersuchung 415
Undecylensäure, Bestimmung der Doppelbindungen 132
Urin, Untersuchung auf Steroide 430

Valeriansäureäthylester, Gehalt in Wein 422
N-TFA-L-Valylglycyl-L-alaninmethylester, Massenspektrum 479
Vanilin, Untersuchung 70
Verteilung, Substanztrennung durch multiplikative Verteilung 284
Vinylacetat, Bestimmung der Doppelbindungen 132
N-Vinylcaprolactam, Bestimmung der Doppelbindungen 140
Vinylcarbazol, Bestimmung der Doppelbindungen 132
Vinylchlorid, Bestimmung der Doppelbindungen 132
N-Vinylimidazol, Bestimmung der Doppelbindungen 140
Vinylmethylketon, Bestimmung der Doppelbindungen 132
Vinylpyrrolidon, Bestimmung der Doppelbindungen 132, 140
Vitamin B_{12}, Struktur 438
Vitamin C, Abtrennung durch Dünnschicht-Chromatographie 309
Vitamine, Trennung der B-Vitamine durch Dünnschicht-Chromatographie 309; fettlöslicher Vitamine durch Dünnschicht-Chromatographie 309

Wachse, Trennung durch Dünnschicht-Chromatographie 308
Wasser, Bestimmung in organischen Substanzen 172, 393; Bestimmung von Carbonat in Leitungs- und Abwasser 108
Wasserstoff, Bestimmung 26, 77; Mikroschnellbestimmung 59; manometrische Bestimmung 85; Mikrobestimmung des aktiven Wasserstoffs 147
Wasserstoff-3, zur Markierung von Corticosteroiden im Blut 574
Wasserstoff-Alkanverhältnis, Bestimmung 406
Wasserstoffwellen, Messung und Differenzierung katalytischer Wasserstoffwellen 201
Weichmacher, Trennung durch Dünnschicht-Chromatographie 309
Weinaroma, Identifizierung von Estern 418
Weine, Estergehalte 422
Weinsäure, Analyse 106; Bestimmung von Carbonat in wäßriger Lösung 108; von Sauerstoff 96

Xanthin, IR-Spektrum 485
p-Xylol, Abtrennung 321

Zellstruktur, Nachweis und Verteilung von Sulfanilylharnstoffen 568
Zimtsäure, Bestimmung der Doppelbindungen 132, 140; des aktiven Wasserstoffes 156; von Sauerstoff 96
Zimtsäurechlorid, zur Wasserbestimmung 178
Zimtsäureester, Gehalt in Wein 422
Zirkonium(IV)-chlorid, zur Wasserbestimmung 177
Zonenschmelzen, Anwendung des Zonenschmelzens 254
Zucker, papierchromatographische Bestimmung 338; Bestimmung von C und H in Rohrzucker 81
Zuckeralkohole, papierchromatographische Bestimmung 338